

Studiengang Life Technologies

Vertiefungsrichtung Analytische Chemie

Diplom 2010

Clémence Berguerand

*Analyse der Auswirkungen von
Lagerungsbedingungen auf die Inhaltsstoffe in
Allium cepa und Strukturaufklärung eines Dipeptids
aus Allium rubellum*

Dozent Prof. Dr. Frans Zonnevillje
Experte Prof. Dr. Michael Keusgen

SI	TV
X	X

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2009/2010	No TD / Nr. DA ca/2010/64
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire Philipps-Universität Marburg	Etudiant / Student Clémence Berguerand	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeurs / Dozenten Frans Zonnevillje Alain-François Grogg	Expert / Experte (données complètes) Prof. Dr. Michael Keusgen Philipps-Universität Marburg Institut für Pharmazeutische Chemie Wilhelm-Roser-Strasse 2 D-35032 Marburg	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja ¹ <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

Titre / Titel

Analyse der Auswirkungen von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt von Cysteinsulfoxiden und Aminosäuren in lyophilisierten Allium-Proben und Strukturaufklärung eines Dipeptids aus Proben von Allium-Wildarten

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss der Lagerungsbedingungen auf den Gehalt von Cysteinsulfoxiden und Aminosäuren in Allium-Proben zu analysieren und zu diskutieren. Hierfür wurden Allium-Proben über 10 Wochen entweder unter Luft. Oder unter Hinzufügung von Ethylen gelagert.

Die lyophilisierten Proben sollen qualitativ und quantitativ ausgewertet werden. Als vorrangige Analyseverfahren werden HPLC- und HPLC MS/MS-Methoden verwendet.

Als weiteres Ziel ist definiert, ein noch nicht identifiziertes Dipeptid, das in Wildarten der Gattung Allium stark konzentriert vorkommt, mit Hilfe von Strukturaufklärungsmethodiken in seiner Struktur aufzuklären. Hierfür werden sowohl analytische und präparative HPLC-Methoden als auch HPLC MS/MS, FT-IR und NMR-Methoden angewendet.

Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
03.05.2010

Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
—

Fin des travaux en laboratoires / Ende Laborarbeiten:
—

Défense orale / Mündliche Verteidigung:
à définir / nach Vereinbarung

Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
à définir / nach Vereinbarung

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

Responsable de la filière
Leiter des Studiengangs:

¹ Etudiant/Student:

¹ Par sa signature, l'étudiant s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition; il s'engage également à appliquer formellement la directive y relative.
Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.



Analyse der Inhaltsstoffe von zwei *Allium*-Arten

Diplomandin Clémence Berguerand

Ziel des Projekts

Erfassung des Einflusses von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt von Cysteinsulfoxiden und Aminosäuren in *Allium cepa* und Strukturaufklärung eines Dipeptides aus *Allium rubellum*.

Methoden | Experimente | Resultate

Ein Lagerungsversuch von Küchenzwiebeln (*Allium cepa*) wurde im Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie, Universität Hohenheim, durchgeführt. Bei Proben aus diesem Versuch sollten die Massenanteile der verschiedenen Aminosäuren und Cysteinsulfoxide für drei Reihen (Kontrolle und Lagerung mit Luft, bzw. Ethylen) bestimmt werden.

Nach einem Auszug mit Methanol und OPA-Derivatisierung wurden die verschiedenen Cysteinsulfoxide und Aminosäuren mittels HPLC quantifiziert. Durch einen t-Test wurde bestimmt, ob die Unterschiede zwischen den drei Reihen signifikant sind.

Die Ergebnisse haben für die Cysteinsulfoxide keinen signifikanten Effekt in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen gezeigt. Für die Aminosäuren war ein Effekt nur für fünf von ihnen (zwischen der Kontrolle und der Lagerung mit Luft) zu beobachten. Es war bei einigen Aminosäuren eine leichte Tendenz zu bemerken, dass Ethylen als Lagermedium besser als Luft ist.

Die Struktur des Dipeptides wurde mittels FT-IR, MS, MS/MS und NMR-Analysen aufgeklärt und bewiesen. Dieses Dipeptid war die 2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfonyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure (γ-Glutamyl-desoxo-methiin).

Diplomarbeit
| 2010 |

Studiengang
Life Technologies

Anwendungsbereich
Analytische Chemie

Verantwortliche/r Dozent/in
Prof. Dr. F. Zonnevillle
frans.zonnevillle@hevs.ch

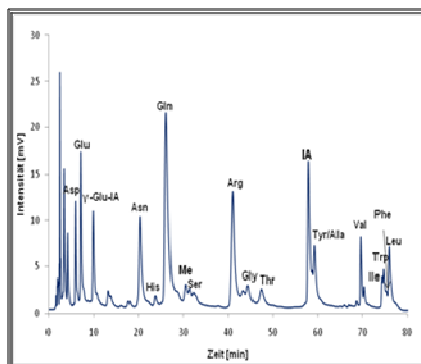
Prof. Dr. M. Keusgen
keusgen@staff.uni-marburg.de

Partner

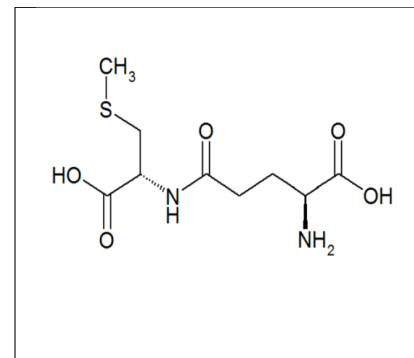


HES-SO Wallis
Route du Rawyl 47
1950 Sitten

Tel. 027 606 85 11
Web www.hevs.ch



HPLC Chromatogramm einer
Allium cepa Probe



Struktur von γ-Glutamyl-
desoxo-methiin aus *Allium*
rubellum

Danksagung

Mein Dank geht an alle, die mich bei dieser Arbeit und während meines Studiums unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen, der es mir ermöglicht hat, in seinem Arbeitskreis meine Bachelorarbeit durch zu führen und immer bereit war mir beratend zur Seite zu stehen.

Herrn Prof. Dr. Frans Zonnevillje, der mir die Stelle in Deutschland vermittelte und für seine Unterstützung während der gesamten Bachelorarbeit. Ebenfalls möchte ich allen Dozenten, bei denen ich in der Lehre war, und besonders Herrn Prof. Dr. Alain-François Grogg, der mir geduldig alle meine Fragen beantwortete.

Meinem Arbeitskreis: Jan Kusterer, Gabriela Mielke für ihre Geduld, ihre Zeit und dem Korrekturlesen meiner Arbeit, Floris van Elsäcker und Matthias Brauschke für ihre Hilfe während der Laborarbeit.

Der NMR-Abteilung und der MS-Abteilung für die gute Zusammenarbeit.

Meinen liebevollen Mitbewohnern, besonders Michaela Maciejek, Patrick Schall, Benjamin Godelet, Tobias Laudahn, Simon Wernhart und Deanna für die gute Atmosphäre, die Unterstützung, das Korrekturlesen und die schöne Zeit.

Ich danke auch meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, für all die Unterstützung während meines Studiums und all die guten Worte. Meinen zwei besten Freundinnen, Déborah und Christelle, will ich hier ebenfalls noch Dank aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Allium</i>	1
1.1.1	Einordnung der Gattung <i>Allium</i>	2
1.1.2	Klassifizierung der Gattung <i>Allium</i>	2
1.1.3	Ausgewählte Arten der Gattung <i>Allium</i>	3
1.2	Inhaltsstoffe der Gattung <i>Allium</i>	4
1.2.1	Cysteinsulfoxide.....	5
1.2.2	Produkte aus der Alliinase Reaktion.....	7
1.3	Lagerungsbedingungen von <i>Allium cepa</i>	11
1.4	Grundlagen zur Bestimmung der Cysteinsulfoxide und Aminosäuren mittels HPLC.....	13
1.5	Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Pflanzenmaterial	18
2.1.3	Geräte	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Auswirkungen von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide in lyophilisierten <i>Allium-cepa</i> -Proben.....	20
2.2.2	Strukturaufklärung von 2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfanyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure aus <i>Allium rubellum</i>	28
3	Resultate	34
3.1	Auswirkungen von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide in <i>Allium cepa</i>	34
3.1.1	Probenvorbereitung	34
3.1.2	Kalibrationsgerade mit L-(+)-Alliin	41
3.1.3	Quantifizierung durch HPLC-Analyse.....	42
3.1.4	Statistische Ergebnisse	46

3.2	Strukturaufklärung	Strukturaufklärung	von	2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfanyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure aus <i>Allium rubellum</i>	48
3.2.1	Struktur des Dipeptids				48
3.2.2	Präparative HPLC und UV-Spektrum				49
3.2.3	Charakterisierung durch FT-IR				50
3.2.4	Charakterisierung mit dem Massenspektrometer				51
3.2.5	Charakterisierung durch das NMR				54
4	Diskussion				55
4.1	Auswirkungen von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide in <i>Allium cepa</i>				55
4.1.1	Methode				55
4.1.2	Lagerungsergebnisse				57
4.2	Strukturaufklärung des Dipeptides aus <i>A. rubellum</i>				61
4.2.1	FT-IR und UV-Spektrum				61
4.2.2	MS-Messungen				61
4.2.3	NMR-Messungen				66
5	Zusammenfassung				68
6	Literaturverzeichnis				69
7	Anhang				73
7.1	Masse-zu-Ladungsverhältnis der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide nach OPA-Derivatisierung bei der HPLC-MS				73
7.2	Chromatogramm von die Probe KOI 7 mit dem HPLC				74
7.3	Chromatogramm von die Probe E 6 mit dem HPLC				74
7.4	Chromatogramm von die Standard Addition von Methiin/Glycin/ Tyrosin/Phenylalalin				75
7.5	Chromatogramm von die Standart Addition von Threonin/Alliin/Alanin				75
7.6	Chromatogramm von die Standard Addition von Leucin				76
7.7	Chromatogramm von die Standard Addition von Isoleucin				76
7.8	Resultate der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Asparaginsäure				77
7.9	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Glutamatsäure				79
7.10	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test	für γ -Glutamyl-Isoalliin			81
7.11	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Asparagin				83
7.12	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Histidin				85

7.13	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Glutamin	87
7.14	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Methiin.....	89
7.15	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Serin	91
7.16	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Arginin	93
7.17	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Threonin	95
7.18	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Glycin	97
7.19	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Isoallin	99
7.20	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Tyrosin/Alanin.....	101
7.21	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Valin	103
7.22	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Tryptophan	105
7.23	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Isoleucin	107
7.24	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Phenylalanin.....	109
7.25	Resultate von der gesamten HPLC-Messung und t-Test für Leucin.....	111
7.26	Chromatogramm von die HPLC-Messung der Extrakt von <i>A. rubellum</i>	113
7.27	Chromatogramm von der präparative HPLC von der γ -Glutamyl-desoxo-methiin.....	114
7.28	UV Spektrum von der γ -Glutamyl-desoxo-methiin	115
7.29	FT-IR Spektrum von der γ -Glutamyl-desoxo-methiin	116
7.30	MS/MS-Spektrum vom Fragment 265 m/z $[M+H]^+$ bei positiver Ionisation dem Dipeptid ohne OPA-Derivatiseirung	117
7.31	MS/MS-Spektrum von dem Fragment 144 m/z $[M+H]^+$	117
7.32	MS/MS-Spektrum bei negativer Ionisation des Dipeptides ohne Derivatisierung.....	118
7.33	NMR-Messung 1H	119
7.34	NMR-Messung ^{13}C	121
7.35	NMR-Messung HH-COSY	121
7.36	NMR-Messung HMQC	122

I Abkürzungsverzeichnis

Folgende Abkürzungen wurden in dieser Arbeit verwendet:

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
bzw.	beziehungsweise
COSY	correlated spectroscopy
ESI	elektrospray-Ionisation
FT-IR	Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
Glu	Glutamat
His	Histidin
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high-performance liquid chromatography
IA	Isoalliin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Me	Methiin
MS	Massenspektrometer
NMR	nuclear magnetic resonance
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
Phe	Phenylalanin
Ser	Serin
Stdabw.	Standardabweichung
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val	Valin

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Systematische Einordnung der Gattung <i>Allium</i> von Takhtajan	2
Tabelle 2 : Pflanzenmaterial von <i>Allium rubellum</i>	19
Tabelle 3 : Verdünnungsteihe des Standard für die Kalibrationsgerade	25
Tabelle 4 : Lösungsmittel-Gradient bei der HPLC-Messung	26
Tabelle 5 : Lösungsmittel-Gradient Programm für die HPLC/MS-Messung	27
Tabelle 6 : Parameter für die MS	28
Tabelle 7 : Gradient für die präparative HPLC-Trennung	30
Tabelle 8 : MS Parameter bei positiv Ionisation	31
Tabelle 9 : MS Parameter bei negativ Ionisation	31
Tabelle 10 : MS/MS Parameter bei positiver Ionisation	32
Tabelle 11 : MS/MS Parameter bei negativer Ionisation	32
Tabelle 12 : Parameter für die NMR Messung	33
Tabelle 13 : Zellenkonzentration in verschiedenen lyophilisierten Zwiebelproben	35
Tabelle 14 : Quantifizierungsfaktor zum Vergleich zweier Methoden	39
Tabelle 15 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide für die Kontrolle und zwei Lagerungsbedingungen	45
Tabelle 16 : IR-Banden der Funktionellen Gruppen von γ -Glutamyl-desoxo-methiin	50
Tabelle 17 : Fragmentierung des Dipeptid nach OPA-Derivatisierung bei MS/MS-Analyse (positive Ionisation)	51
Tabelle 18 : Fragmentierung des Dipeptides ohne OPA-Derivatisierung bei der MS/MS-Analyse	52
Tabelle 19 : Charakteristische Fragmente der MS/MS Analyse vom Fragment 144 m/z	52
Tabelle 20 : Fragmentierung des Dipeptides ohne Derivatisierung mit OPA-Reagenz	53
Tabelle 21 : NMR-Signale von γ -Glutamyl-desoxo-methiin	54

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Darstellung der Gattung <i>Allium</i>	3
Abbildung 2 : Struktur sechs wichtiger Cysteinsulfoxide der Gattung <i>Allium</i>	6
Abbildung 3 : Enzymatische Reaktion der Alliinase mit verschiedenen Cysteinsulfoxiden und Bildung von primären Aromakomponenten (Thiosulfinate)	8
Abbildung 4: Bildung von Z-Propanthial-S-oxid und von Thiosulfinat aus Isoalliin	9
Abbildung 5: Sekundäre Aromakomponenten aus <i>A. cepa</i>	9
Abbildung 6 : Primäre Aromakomponenten von <i>A. sativum</i>	10
Abbildung 7 : Sekundär Aromakomponenten von <i>A. sativum</i>	11
Abbildung 8 : Schema der Derivatisierung von Cysteinsulfoxiden mit OPA	14
Abbildung 9 : Reaktion von 2-Methyl-2-propanthiol mit Iodoacetamid.....	14
Abbildung 10 : Mikroskopische Bilder der lyophisierten Proben	35
Abbildung 11 : Chromatogramm des wässrigen Auszugs (Probe KOII 4)	36
Abbildung 12 : Chromatogramm des methanolischen Auszuges (Probe KOII 7)	37
Abbildung 13 : Chromatogramm einer Extraktion (Probe KOII 4)	38
Abbildung 14 : Chromatogramm einer HPLC-MS-Messung (KOI 1).....	40
Abbildung 15 : Kalibrationsgerade mit L-(+)-Alliin	41
Abbildung 16 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe I	42
Abbildung 17 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe II	43
Abbildung 18 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe III	43
Abbildung 19 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe IV.....	44
Abbildung 20 : Struktur von γ -Glutamyl-desoxo-methiin	48
Abbildung 21 : Struktur von γ -Glutamyl-desoxo-methiin nach OPA-Derivatisierung	49
Abbildung 22 : Fragment der Dipeptid nach die MS/MS Fragmentierung vom Massenpeak	61
Abbildung 23 : Fragmentierungs-Schema von γ -Glutamyl-desoxo-methiin ohne OPA-Derivatisierung bei positiver Ionisation	62
Abbildung 24 : Fragmentierungs-Schema der MS/MS-Fragmentierung vom Fragment 144 m/z.....	63
Abbildung 25 : MS/MS-Fragmentierungs-Schema von γ -Glutamyl-desoxo-methiin ohne OPA-Derivatisation im negativen Modus I	64
Abbildung 26 : Fragmentierungs-Schema von Glutamyl-desoxo-methiin ohne OPA-Derivatisierung im negativen Modus II	65
Abbildung 27 : Strucktur der Dipeptid nach die OPA-Derivatisierung mit nummerierten Kohlenstoffatomen.....	66

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Allium*

Allium gehört mit zu den wichtigsten Gattungen im Pflanzenreich und zählt mehr als 750 Arten. Die bekanntesten Arten dieser Gattung sind: Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.), Knoblauch (*Allium sativum* L.), Schalotte (*Allium ascalonium* L.) und Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.). Diese Arten kommen in Europa, Nordamerika, Nordafrika und Asien vor [1]. Der Schnittlauch ist die einzige kultivierte Art, die ihren Ursprung in Europa hat. Die anderen *Allium*-Arten sind im Laufe der Geschichte nach Europa gebracht worden [2]. Seit langer Zeit werden *Allium*-Arten als Lebensmittel, Gewürze und zu medizinischen Zwecken in der ganzen Welt verwendet [1].

Im Allgemeinen sind die Blätter von *Allium*-Arten grasähnlich, grundständig und ungestielt. *Allium*-Arten bilden in der Regel Zwiebeln aus. Einige Arten haben Rhizome oder verdichtete Wurzeln. Die Gestalt der Blüten reicht von flach bis hin zur kugeligen Dolde. Sie sind klein und lang gestielt. Die Frucht ist eine dreigeteilte Kapsel mit 1-2 Samen in jedem Kompartiment, die oft auf der Oberseite abgeflacht ist [1].

Eine grundsätzliche Charakteristik von *Allium*-Arten ist der spezifische, strenge knoblauchartige Geruch und Geschmack [1]. Ein wichtiger sekundärer Stoffwechselweg für Zwiebelgewächse ist die Bildung von Schwefelverbindungen, den Cysteinsulfoxiden. Diese Inhaltsstoffe werden mit Hilfe des Enzyms Alliinase umgesetzt und die Reaktionsprodukte werden als chemische Abwehr gegenüber parasitären Organismen angesehen [3].

Diverse *Allium*-Arten zeigen positive Wirkungen auf den menschlichen Organismus. Es zeigte sich, dass *A. sativum* einen antibakteriellen und antidiabetischen Effekt hat und vorbeugend gegen verschiedene Krebsarten des Verdauungssystems wirkt [3-6]. Diese positiven Effekte korrelieren mit dem Vorkommen von Schwefelverbindungen [7, 8].

1.1.1 Einordnung der Gattung *Allium*

Die Gattung *Allium* gehört zu den Angiospermen. Die systematische Einordnung wurde von Takhtajan 1997 neu vorgenommen. Sie ist in Tabelle 1 wiedergegeben [9].

Tabelle 1: Systematische Einordnung der Gattung *Allium* von Takhtajan

Klasse	<i>Liliopsida</i>
Unterklasse	Liliidae
Überordnung	<i>Lilianae</i>
Ordnung	<i>Amaryllidaceae</i>
Familie	<i>Alliaceae</i>
Unterfamilie	<i>Allioideae</i>
Tribus	<i>Allieae</i>
Gattung	<i>Allium</i>

1.1.2 Klassifizierung der Gattung *Allium*

Die Gattung *Allium* ist monophyletisch und lässt sich in drei evolutionäre Linien aufteilen. Die Klassifizierung der Gattung *Allium* wird schon seit langer Zeit vorgenommen und erfolgte zuerst nach Geschmack und Geruch. Ab dem 20. Jahrhundert waren die Klassifikationskriterien Morphologie, Anatomie, Karyotypisierung und Photochemie. Der „Gatersleben classification approach“ von Hanelt (1992) war die letzte Klassifizierung mit diesen Kriterien. Mittlerweile wird eine neue Methode zur Klassifikation der Gattung *Allium* verwendet. Sie bedient sich molekularbiologischer Methoden [2]. Die letzte publizierte Klassifikation (von Friesen [10]) basiert auf der Analyse von Sequenz-Daten der internen Transkriptionsspace Region (ITS) von nuklearer ribosomaler DNA (nrDNA), um die phylogenetische Verwandtschaft der ganzen Gattung *Allium* zu

klassifizieren. Hiermit wurde die Gattung *Allium* in 15 Untergattungen und 63 Sektionen eingeteilt (s. Abbildung 1) [10].

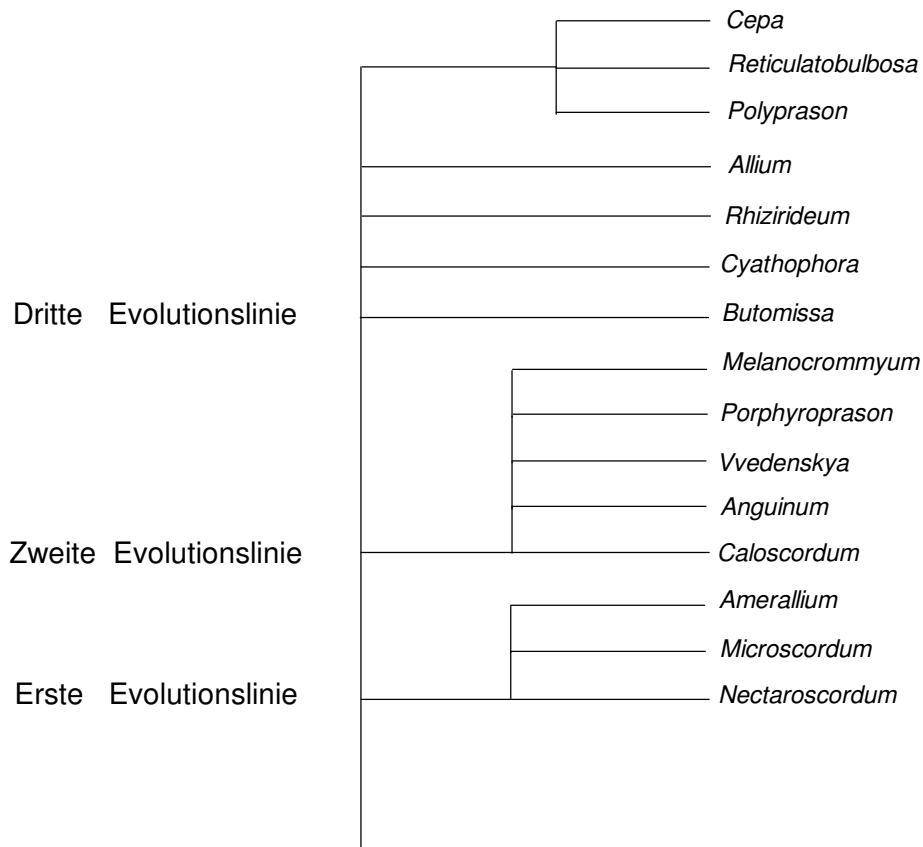


Abbildung 1 : Darstellung der Gattung *Allium*
Sie zeigt die drei Evolutionslinien (links) und die Untergattungen rechts

1.1.3 Ausgewählte Arten der Gattung *Allium*

1.1.3.1 *Allium cepa*

Die Küchenzwiebel, *Allium cepa*, wurde in die Untergattung *Cepa*, Sektion *Cepa* eingeordnet [10]. Die Küchenzwiebel kommt wahrscheinlich aus Zentralasien und wurde vor ca. 2000 Jahren nach Europa gebracht. Sie ist in der ganzen Welt als Gemüse und Gewürz bekannt und nimmt eine wichtige ökonomische Rolle ein. Sie befindet sich auf Platz zwei in der Liste der kultivierten Nutzpflanzen auf der ganzen Welt. Mehrere Studien zeigen [9], dass die Küchenzwiebel einen positiven medizinischen Nutzen aufweist. Schon die alten Ägypter erkannten den

medizinischen Nutzen und verwendeten sie. Die Küchenzwiebel wirkt antimikrobiell, antibakteriell, antiasthmatisch und präventiv gegenüber Magen- und Darmkrebs sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen [3, 4, 11].

Die folgenden Cysteinsulfoxide können in der Küchenzwiebel vor: Isoalliin ((+)-S-(trans-1-Propenyl)-L-cysteinsulfoxid), Methiin ((+)-S-(Methyl)-L-cysteinsulfoxid) und Propiin ((+)-S-(Propyl)-L-cysteinsulfoxid) [12].

1.1.3.2 *Allium rubellum*

Allium rubellum wird in die Untergattung *Allium*, Sektion *Avulsea* eingeordnet [10]. Diese Art kommt im Bereich vom Ural bis Nordwest-Indien und zwischen dem Kaukasus und Sibirien vor. In Indien kann *A. rubellum* in Junjab und im westlichen Himalaya-Gebirge auf einer Höhe von 450 bis 2400 Metern gefunden werden [13].

1.1.3.3 *Allium stipitatum*

Allium stipitatum wird in die Untergattung *Melanocrommyum*, Sektion *Procerallium* und Untersektion *Elatae* [10] eingeordnet. Diese *Allium*-Art wird in Zentralasien bei der einheimischen Bevölkerung zum Würzen von Gemüse und als Heilpflanze verwendet [14].

1.2 Inhaltsstoffe der Gattung *Allium*

Die verschiedenen *Allium*-Arten, die bisher untersucht wurden, enthalten zu ca. 90% Wasser. Daneben ließen sich Vitamine, Fruktane, Saponine und Flavonoide finden. Die Hauptinhaltsstoffe sind Schwefelverbindungen, hier sind vor allem die Cysteinsulfoxide und ihre Speicherform zu nennen [8, 9].

1.2.1 Cysteinsulfoxide

Allium-Arten bestehen zu 1-5% ihres Trockengewichtes aus Sekundärmetaboliten schwefelhaltiger Aminosäuren, die nicht an Proteine gebunden sind [7].

Cysteinsulfoxide werden aus der Aminosäure Cystein gebildet. Der Wasserstoff am Schwefelatom des Cysteins wird dabei von einer Alkyl- bzw. Alkenyl-Gruppe ersetzt und der Schwefel wird zum Sulfoxid oxidiert. Aufgrund der zwei Stereozentren gibt es theoretisch vier verschiedene Diastereomere. In der Natur kommt jedoch nur das L-(+)-Isomer vor [1].

Obwohl die Cysteinsulfoxide geruchlos sind, spielen sie eine entscheidende Rolle für den Geschmack und Geruch von *Allium*-Pflanzen. Sie sind die Vorstufen der Komponenten, die ihr typisches Aroma ausmachen. Bei Beschädigung der Zelle werden sie durch das Enzym Alliinase zu Alk(en)ylthiosulfinate umgewandelt (s. Kap. 1.2.2) [7]. Aus Alliin wird Allicin gebildet. Es ist charakteristisch für Knoblauch. Isoalliin und eine geringe Menge von anderen Cysteinsulfoxiden machen den typischen Geruch der Zwiebel aus. Wenn Isoalliin zusammen mit Propiin im richtigen Verhältnis vorkommt, so bemerkt man den typischen Geruch von Lauch. Methiin bewirkt hingegen einen unangenehmen und starken Geschmack und Geruch. Daher sind die unterschiedlichen Zusammensetzungen und die Konzentrationen der Cysteinsulfoxide verantwortlich für die Art und Intensität des Geschmacks und Geruchs einer *Allium*-Art [15].

Die vier wichtigsten Cysteinsulfoxid sind: (+)-S-(2-Propenyl)-L-cysteinsulfoxid (Alliin), (+)-S-(trans-1-Propenyl)-L-cysteinsulfoxid (Isoalliin), (+)-S-(Methyl)-L-cysteinsulfoxid (Methiin) und (+)-S-(Propyl)-L-cysteinsulfoxid (Propiin) (s. Abbildung 2). Sie wurden im Zeitraum von 1947-1968 entdeckt und isoliert [1, 7]. Methiin ist das vorherrschende Cysteinsulfoxid in der ganzen Evolutionslinie der Gattung *Allium*[15]. Es lässt sich in *A. sativum*, *A. cepa*, *A. porrum*, *A. ursinum* und auch in einigen Pilzen finden [1, 2]. Propiin und Alliin sind charakteristisch

für *A. porrum* und *A. sativum* [1, 7]. Isoalliin ist der Precursor des Tränenfaktors (s. Abbildung 4) in *A. cepa* [16]. Vor kurzer Zeit wurden (+)-S-(Ethyl)-L-cysteinsulfoxid (Ethiin) und (+)-S-(Butyl)-L-cysteinsulfoxid (Butiin) (s. Abbildung 2) in verschiedenen *Allium*-Arten gefunden, jedoch immer in niedrigen Konzentrationen [17-19]. Ebenfalls erst vor kurzer Zeit wurden weitere neue Cysteinsulfoxide entdeckt. Es handelt sich dabei um (R)-S-(2-Hydroxyethyl)-cysteinsulfoxid [20], (+)-S-(3-Pyrrolyl)-L-cysteinsulfoxid [21], L-(+)-S-(2-Pyridyl)-cysteinsulfoxid [14], (+)-S-(1-Butenyl)-L-cysteinsulfoxid (Homoisoalliin) und das S-(1-Butenyl)-L-cystein (Desoxyhomoisoalliin) [22].

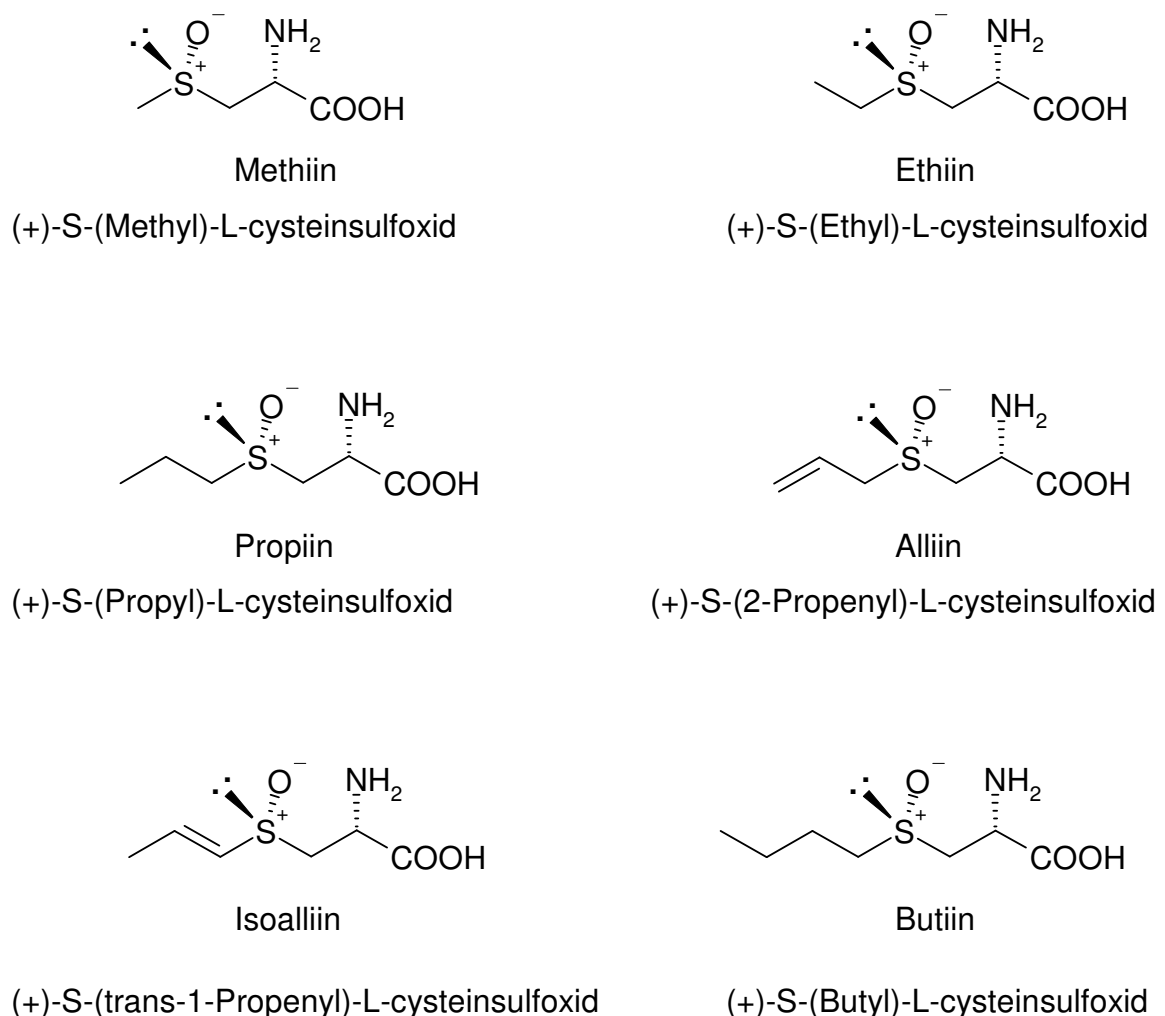


Abbildung 2 : Struktur sechs wichtiger Cysteinsulfoxide der Gattung *Allium*

Die Aminogruppe der Cysteinsulfoxide kann durch einen Glutamyl-Rest substituiert sein. Bisher wurden 24 verschiedene γ -Glutamylpeptide in *Allium*-Arten isoliert [1]. Bei neun von ihnen handelt es sich um Zwischenstufen in der Biosynthese der Cysteinsulfoxide. Es handelt sich dabei um die wichtigste Rolle dieser Dipeptide [23, 24, 25]. Als weitere Funktion der Peptide wird angenommen, dass sie als Speicher für Stickstoff und Schwefel für die Zeit der Keimung und Samenbildung dienen [26].

1.2.2 Produkte aus der Alliinase Reaktion

Alliinase ist das bekannteste und auch am stärksten experimentierte Enzym der Gattung *Allium* [25]. Es ist sehr stabil und es existieren mehrere Isoenzyme von ihm. Bei allen *Allium*-Arten mit Ausnahme von Lauch und Bärlauch handelt es sich bei der Alliinase um ein Glykoprotein. Die Struktur der Alliinase ist schwierig aufzuklären. Man hat es aber geschafft seine Struktur in verschiedenen *Allium*-Arten zu untersuchen. Bei der Alliinase der Küchenzwiebel handelt es sich um ein Tetramer, bei Knoblauch um ein Homodimer [1, 19, 25].

Die Alliinase besitzt eine C-S-Lyase-Aktivität. Sie spaltet die C β -S γ -Bindung der Cysteinsulfoxide. Das Enzym benötigt Pyridoxal-5'-Phosphat als Kofaktor [27]. In *Allium cepa* hydrolysiert das Enzym an erster Stelle Isoalliin, dann Methiin und Propiin. In *Allium sativum* hydrolysiert das Enzym schneller Alliin als Methiin [1, 24].

Wenn die Zellen von *Allium* intakt sind, ist die Alliinase in der Vakuole und sein Substrat im Cytosol lokalisiert [28]. Aber nach Verletzung der Zwiebel kommt das Enzym mit seinem Substrat in Kontakt und es spaltet die Cysteinsulfoxide (s. Abbildung 3). Die Alliinase katalysiert dabei die Abspaltung der S-Alk(en)yl-Sulfoxid-Gruppe vom Cysteinsulfoxid. Dadurch entstehen als erstes zwei Produkte, die beide nicht stabil sind. Es handelt sich um α -Iminopropionsäure und Sulfensäure. Die α -Iminopropionsäure hydrolysiert spontan zu Brenztraubensäure und Ammoniak. Zwei Sulfensäuren kondensieren zu Thiosulfinaten. In Abhängigkeit von der Cysteinsulfoxid-Zusammensetzung der *Allium*-Arten können aus der Reaktion viele verschiedene Thiosulfinate

hervorgehen (s. Abbildung 3). Die Thiosulfinate (primäre Aromakomponenten) sind jedoch nicht besonders stabil und reagieren weiter zu sekundären Aromakomponenten. Zusammen sind sie für den Geschmack von frischen Zwiebeln verantwortlich [1, 25, 29].

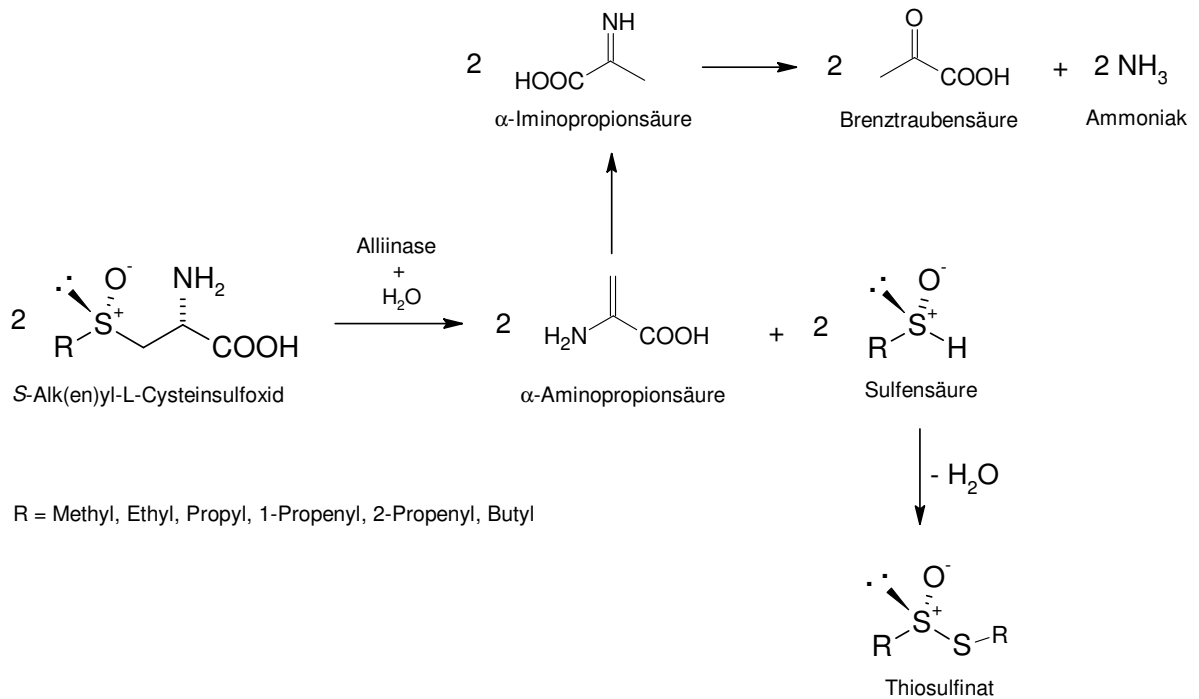


Abbildung 3 : Enzymatische Reaktion der Alliinase mit verschiedenen Cysteinsulfoxiden und Bildung von primären Aromakomponenten (Thiosulfinate)

1.2.2.1 Primäre und sekundäre Aromakomponenten der Küchenzwiebel

In der Küchenzwiebel kommt überwiegend Isoalliin vor. Nach Spaltung durch Alliinase entsteht aus diesem Cysteinsulfoxid 1-Propenylsulfensäure; sie reagiert mit dem Enzym Propanthial S-oxid Synthase zu Z-Propanthial-S-oxid. Dieses wird als Tränenfaktor („lachrymatory factor“, LF) bezeichnet (s. Abbildung 4), welches sehr flüchtig ist [7, 25, 30]. Die 1-Propenylsulfensäure reagiert auch spontan zu Thiosulfinaten (s. Abbildung 4).

Einleitung

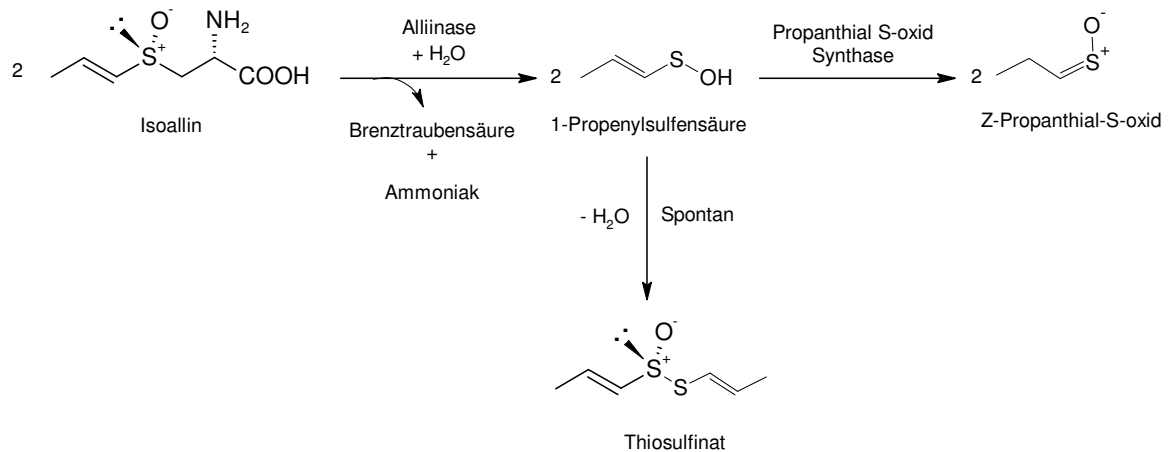


Abbildung 4: Bildung von Z-Propanthial-S-oxid und von Thiosulfinat aus Isoalliin

In der Küchenzwiebel kommen mehrere verschieden Cysteinsulfoxide vor, die nach der Alliinase-Reaktion zu vielen verschiedenen Thiosulfinaten reagieren. Die Reaktion des Isoalliins mit der Alliinase ist dann nur eine von vielen Reaktionen.

Aus der Alliinase-Reaktion entstehen als sekundäre Aromakomponenten in der Küchenzwiebel Cepaen, Zwiebelan und das 3,5-Diethyl-1,2,4-trithiolan (s. Abbildung 5) [7, 31].

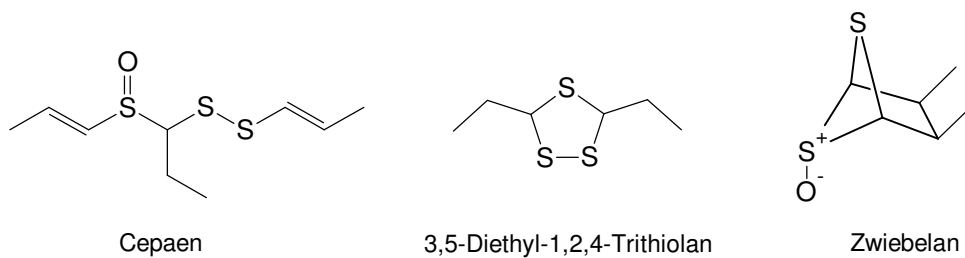


Abbildung 5: Sekundäre Aromakomponenten aus *A. cepa*

1.2.2.2 Primäre und sekundäre Aromakomponenten des Knoblauchs

Im Knoblauch kommen die Cysteinsulfoxide Alliin (85%), Methiin (10%) und Isoalliin (5%) vor. Das Alliin und das dazugehörige γ -Glutamyl-Alliin werden häufiger als andere Schwefelverbindungen im Knoblauch gebildet [1, 7]. Wenn der Knoblauch geschnitten wird, läuft die Alliinase-Reaktion wie bereits erklärt ab (s. Abschnitt 1.2.2). Das Substrat Alliin überwiegt mengenmäßig. Die Sulfensäure, die demnach am stärksten gebildet wird, ist die Allylsulfensäure. Sie kondensiert zu Diallylthiosulfinat (Allicin). Allicin ist das Thiosulfinat, das im Knoblauch am häufigsten vorkommt (70% der gesamten Thiosulfinate). Am zweithäufigsten wird das Allylmethanthiosulfinat gebildet (12%) (s. Abbildung 6). Es entsteht aus Methiin [1, 27]. Wie schon erwähnt, sind Allicin und Allylmethanthiosulfinat nicht sehr stabil und wandeln sich bei Raumtemperatur langsam in sekundäre Aromakomponenten um. So entstehen Ajoen, 2-Vinyl-4H-1,3-dithiin, 3-Vinyl-4H-1,2-dithiin und Diallyl(poly)sulfid (s. Abbildung 7) [1, 7].

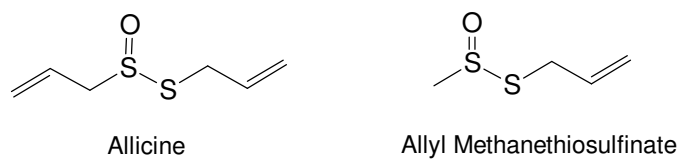
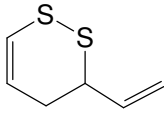
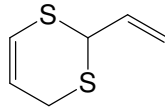


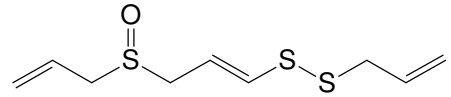
Abbildung 6 : Primäre Aromakomponenten von *A. sativum*



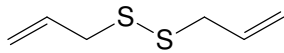
3-Vinyl-(4H)-1,2-dithiin



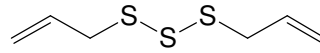
2-Vinyl-(4H)-1,3-dithiin



Ajoen



Diallyldisulfid



Diallyltrisulfid

Abbildung 7 : Sekundär Aromakomponenten von *A. sativum*

1.3 Lagerungsbedingungen von *Allium cepa*

Bei einer Zwiebel handelt es sich um ein Speicherorgan. Ihre Rolle ist die Lebensfähigkeit der Pflanzen während ungünstigster Perioden im Jahr, z.B. im Winter, zu erhalten. Während dieser Zeit befindet sich die Zwiebel in Keimruhe. Unter bestimmten Bedingungen kann die Keimruhe sehr schnell aufgehoben werden. Im Anschluss an diese Periode fängt die Zwiebel an zu keimen. Daher ist vor und nach der Ernte der Zwiebeln eine bestimmte Behandlung nötig, um die Keimung zu hemmen. Eine keimende Zwiebel ist keine verkaufsfähige Ware [32].

Einige Parameter vor der Ernte können die Qualität der Zwiebeln während der Lagerung beeinflussen. Dabei handelt es sich um die Menge der Düngung, die Temperatur und die Feuchtigkeit auf dem Feld. Der Erntezeitpunkt hat auch einen Einfluss auf die Dauer der Keimruhe der Zwiebeln [32].

Nach der Ernte und noch vor der Lagerung müssen die Zwiebeln antrocknen. Während dieser Phase trocknen die äußeren Schichten und bilden eine Barriere gegenüber Wasserverlust und gegenüber Bakterien [32].

Während der Zwiebellagerung soll die Zwiebelqualität, die zum Zeitpunkt der Ernte vorlag, erhalten bleiben. Wichtige Kriterien sind der Geschmack, Geruch und Aspekte wie Farbe und Zwiebelfestigkeit. Dennoch kommt es während der Lagerung zu einigen Veränderungen. Es kommt durch Atmung und Verdampfen von Wasser zu Feuchtigkeitsverlust. Die Menge der Atmung verhält sich exponentiell zur Lagerungstemperatur. Die relative Feuchtigkeit der Luft muss unter 80% gehalten werden, damit sich die Krankheitserreger nicht vermehren können. Die Kohlenhydrate und Cysteinsulfoxide sind Komponenten, die den Zwiebelgeschmack beeinflussen. Fructose, Glucose, Sucrose und ein paar Oligofructane sind die überwiegend vorhandenen Zucker. Die Konzentration und Zusammensetzung der Zucker ändert sich während der Lagerung. Die Fructane hydrolysieren teilweise zu Fructose. Die Cysteinsulfoxide spielen als Aromaprecursoren eine besondere Rolle für den Geschmack von Zwiebelgewächsen. Die Änderung des Geschmacks und Geruchs zwischen frisch geernteten und ein paar Wochen gelagerten Zwiebeln resultieren vor allem aus den Konzentrations- und Kompositionsänderungen sämtlicher Cysteinsulfoxide [32].

Um den Zustand der Keimruhe zu erhalten, sind verschiedene Methoden entwickelt worden. Darunter fällt die Lagerung bei 5°C unter konstanter Norm-Atmosphäre (21% Sauerstoff und ungefähr 0,1% Kohlenstoffdioxid) oder unter einer tiefen Temperatur mit kontrollierter Atmosphäre (hohe Menge an Kohlenstoffdioxid und geringe Menge an Sauerstoff). Als dritte Möglichkeit gibt es noch die Methode, eine Mischung aus Ethylen und Luft zu benutzen. Eine konstante Begasung mit gleich bleibender Konzentration an Ethylen (10 µL/L) wird während der Zwiebellagerung verwendet. Es hat den Effekt, dass die Keimung der Zwiebeln und die Regulation des Wachstums und des Alterns unterdrückt werden [33, 34].

Nach der Lagerung werden die Zwiebeln gewaschen und für den Verkauf verpackt [32].

Zur Analyse des Effektes, den die Lagerung auf die Cysteinsulfoxide und den Geschmack ausübt, stehen mehrere analytische Methoden zur Verfügung. Zum einen kann die Brenztraubensäure quantifiziert werden, welche aus der Alliinase-Reaktion entsteht, und mit dem Geschmack korreliert. Die Analyse der Kohlenhydrate gibt auch Information über die Geschmacksveränderung. Als letzte Möglichkeit kann auch noch die Gesamtmenge an Cysteinsulfoxiden quantifiziert werden [32, 12].

1.4 Grundlagen zur Bestimmung der Cysteinsulfoxide und Aminosäuren mittels HPLC

Die Bestimmung und die Quantifizierung der Cysteinsulfoxide in *Allium*-Arten oder anderer Proben kann mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) vorgenommen werden. Die Analyse von Aminosäuren mittels Gaschromatographie ist ebenfalls möglich, wurde aber nicht durchgeführt, da die Cysteinsulfoxide thermoinstabil sind, wenn gleich diese Methode eine höhere Auflösung hat und feinere Resultate erzielt [35]. Daher ist die gängigste Methode für die Bestimmung der Cysteinsulfoxide eine Auftrennung mittels HPLC nach Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA).

Die primäre Aminofunktion reagiert mit OPA und 2-Methyl-2-propanthiol zu einem Isoindol (s. Abbildung 8). Das Isoindol besitzt eine starke Absorption bei 334 nm. Diese Methode ist sehr sensitiv. Es lassen sich Molekül-Konzentrationen bis in den ppm-Bereich bestimmen. Nach Derivatisierung wird Lidacetamid hinzugegeben, um das überschüssige 2-Methyl-2-propanthiol umzusetzen (s. Abbildung 9).

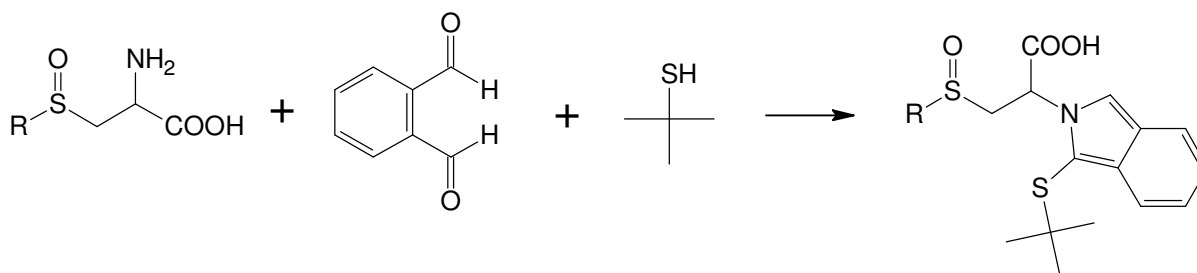


Abbildung 8 : Schema der Derivatisierung von Cysteinsulfoxiden mit OPA

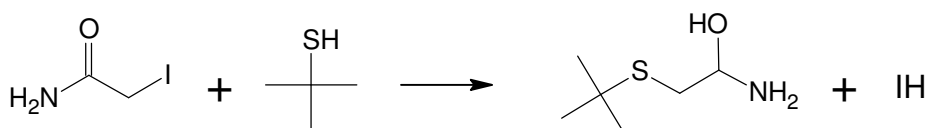


Abbildung 9 : Reaktion von 2-Methyl-2-propanthiol mit Iodoacetamid

1.5 Ziel der Arbeit

Aus wirtschaftlichen Aspekten ist die Lagerung von Küchenzwiebeln sehr bedeutend, denn keimende Zwiebeln können nicht mehr verkauft werden. Außerdem soll durch die Lagerung der Zwiebel der Geschmack nicht verfälscht werden. Das Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie der Universität Hohenheim führte aus diesem Grund im Herbst 2008 einen Lagerungsversuch durch, in dem die Auswirkungen der Lagerung auf die Qualität der Zwiebeln untersucht werden sollten. Dafür wurden die Zwiebeln während acht Wochen mit zwei verschiedene Lagerungsbedingungen gelagert: Unter einer Normalen- und einer Ethylen-Atmosphäre. Diese Proben sollten in dieser Arbeit auf ihre Qualität hin untersucht werden. Dazu sollten die Inhaltstoffe beziehungsweise die S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxide und die Aminosäuren quantifiziert werden. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob es einen Unterschied zwischen den verschiedenen Proben, die unterschiedlich gelagert wurden, gibt. Diese Quantifizierung wurde mit einer HPLC-Methode für die Analyse von Cysteinsulfoxiden und Aminosäuren vorgenommen.

Das zweite Ziel war es in einer wilden Art von *Allium (rubellum)* eine Analyse der Cysteinsulfoxide durchzuführen und herauszufinden, ob in dieser Art dieselben Cysteinsulfoxide wie in der Küchenzwiebel vorhanden sind. Außerdem sollte ein unbekanntes Dipeptid aus dieser Art in seiner Struktur aufgeklärt werden. Die Isolation des Dipeptides sollte mittels präparative HPLC stattfinden. Um die Struktur aufzuklären, wurden verschiedene Methoden verwendet : NMR, MS und MS/MS.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

- Methanol (HPLC) CH_4O : Merck I501313937 937, CAS 67-56-1, 99.8 %, giftig, hochentzündlich
- Methanol (HPLC-MS) CH_4O : Merck I06035.1000, CAS 67-56-1, 99.9 %, giftig, hochentzündlich
- Methanol D4 (HDOH, $\text{D}_2\text{O} < 0.03 \%$) : Euriso-top, DO24F Y2191, CAS 811-98-3, $\geq 99.8\%$, giftig, leichtentzündlich
- Acetonitril (HPLC) $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$: Sigma Aldrich 34851, CAS 75-05-8, $\geq 99.9 \%$, giftig, leichtentzündlich
- Acetonitril (HPLC-MS) $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$: Merck I395029 747, CAS 75-05-8, $\geq 99.9 \%$, giftig, leichtentzündlich
- Aceton $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: Merck 822251, CAS 67-64-1, $\geq 99.0\%$, reizend, leichtentzündlich
- Ethanol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: Merck 818760, CAS 64-17-5, $\geq 99.5 \%$, KQ300000, hochentzündlich
- Phosphorsäure H_3PO_4 : Caesur et Lorentz 7033, CAS 7664-38-2, 25 %, ätzend
- Essigsäure $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$: ACROS organics 222 140025, CAS 64-19-7, 99.8%, ätzend
- Natriumhydroxid NaOH : Carl Roth Art. Nr. 9356.1, CAS 1310-73-2, $\geq 99 \%$, ätzend
- Trifluoressigsäure CF_3COOH : Solvay, CAS 76-05-1, $\geq 99 \%$, ätzend
- Phthaldialdehyde $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$: Sigma 79760 , CAS 643-79-8, $\geq 99 \%$, giftig, umweltgefährdend
- 2-Methyl-2-propanethiol $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{S}$: Aldrich 109207, CAS 75-66-1, 99 %, leichtentzündlich, reizend
- Natriumhydrogenphosphat NaH_2PO_4 : Riedel de Haen 04270, CAS 89140-32-9, 98 %, -

- Di-Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 : Carl Roth Art. Nr. T876.2, CAS 7558-79-4, $\geq 98 \%$, -
- Ammoniumacetat $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$: Carl Roth Art. Nr. T872.2, CAS 631-61-8, $\geq 96\%$, -
- Natriumtetraborat Decahydrat $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$: Fluka 72002, CAS 1303-96-4, $\geq 99 \%$, -
- Ethylacetat $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$: Sigma-Aldrich 2722, CAS 141-78-6, $\geq 99.9 \%$, leichtentzündlich, reizend
- Natriumsulfat Na_2SO_4 : Merck 1.06649.0500, CAS 7757-82-6, $\geq 99.9 \%$, A663249602, -
- L-Leucin $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$: Fluka 61819, CAS 61-90-5, $\geq 99.5 \%$, EC No 20005220, -
- L-Isoleucin $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$: Fluka 58879, CAS 1509-34-8, $\geq 99.5 \%$, EC No 2007982, -
- Glycin $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$: Merck 1.04169.0250, CAS 56-40-6, $\geq 99.7 \%$, K33743569526, -
- L-Tyrosin $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$: Merck 1.08371.0025, CAS 60-18-4, $\geq 99 \%$, K31192971240, -
- L-Phenylalanin $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$: Fluka 78020, CAS 63-91-2, $\geq 99.0 \%$, EC No 2005681, -
- L-Threonin $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$: Merck 1.08411.0010, CAS 28954-12-3, $\geq 99 \%$, K30511611239, -
- L-Alanin $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$: Merck 1.01007.0025, CAS 56-41-7, $\geq 99 \%$, K31848207714, -
- Natrium Na : Merck 8.22284.0250, CAS 7440-23-5, $\geq 99 \%$, S5183884842, hochentzündlich, ätzend
- L-Cystein $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$: Aldrich 168149, CAS 52-90-4, $\geq 97\%$, -
- Allylbromid $\text{C}_3\text{H}_5\text{Br}$: Sigma A8892, CAS 106-95-6, $\geq 99 \%$, giftig, hochentzündlich
- Iodomethane CH_3I : Riedel-de Haën 03810, CAS 74-88-4, $\geq 99 \%$, UN No 2644, giftig
- Wasserstoffperoxid H_2O_2 : Merck 1.08600.1000, CAS 7722-84-1, 35.0-36.5 %, K40027400922, reizend

2.1.2 Pflanzenmaterial

2.1.2.1 Gefriergetrocknete *Allium cepa* „Copra“ Proben

Das Lagerversuch wurde von der Universität Hohenheim (Institut für Sonderkulturen und Produktionphysiologie) folgendermaßen durchgeführt: Die Zwiebeln wurden ca. drei Wochen nach der Ernte auf verschiedene Behälter verteilt und dann bei 18°C im Durchfluss entweder mit Luft als Kontrolle oder 10-12 ppm Ethylen in Luft kontinuierlich begast. Es wurden wöchentlich Proben entnommen. Die Proben, die zur Verfügung standen, waren die vom Beginn und Ende des Versuches.

Die gefriergetrockneten Zwiebelproben sind aus den Zwiebelquerschnitt in Äquatornähe von der Art *Allium cepa* „Copra“. Die Proben waren in Probenvorbereitungsgefäßen geliefert, die ca. 150 mg Zwiebeltrocknpulver enthielten. Die Proben waren in drei Kategorien unterteilt:

- Kategorie 1 : KOI, Proben von Beginn des Experimentes (08.09.08)
- Kategorie 2 : KOII, Proben vom Ende des Experimentes, Kontrolle, mit Luft gelagert und 18°C (03.11.08)
- Kategorie 3 : E, Proben vom Ende des Experimentes, mit 10-12 ppm Ethylen in Luft gelagert und bei 18°C (04.11.08)

Jede Kategorie enthält 10 Proben, die von 10 verschiedenen Zwiebeln stammen. Aber die Proben E 5 und E 8 der E Probe wurden nicht mitgeschickt. Darum wurden nur die anderen acht Proben gemessen.

2.1.2.2 *Allium rubellum*

Die Informationen über das vorliegende Pflanzenmaterial von *Allium rubellum* sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2 : Pflanzenmaterial von *Allium rubellum*

Datum der Sammlung	Accession	Ort der Sammlung
01.06.2010	3000 Expedition Fritsch Armenien 2010	Gorovanskie peski zakasnik S Erevan Flat terraces of sandy limestone, 956 m

2.1.3 Geräte

2.1.3.1 HPLC

- HPLC : Merck Hitachi D-7000 LaChrom
- Software : LaChrom HPLC System
- Säule : EC 250/4 Nucleodur 100-5 C18 EC
- Detektion : UV

2.1.3.2 HPLC/MS

- HPLC : Shimadzu LC 20
- Software : Shimadzu Controller SCL10Avp
- Säule : VP 250/2 Nucleodur 100-5 C18 EC
- Detektion : UV, MS : QTrap 2000, Turbolonspray Ion Source (ESI-MS)

2.1.3.3 Präparative HPLC

- HPLC : Waters (600 E System Controller)
- Software : Water 991 Photodiode Array Detectors
- Säule 1 : VP 250/21 Nucleodur 100-5 C18 EC
- Detektion : UV, PDA : 991 Waters PDA

2.1.3.4 NMR Spektrometer

- JEOL-ECX 400

2.1.3.5 FTIR

- Bruker Alpha-P

2.1.3.6 Sonstige Geräte

- Mikroskop : Olympus CKX41
- Kamera : Olympus E-330
- pH-Meter : Microprocessor pH/ION Meter PMX 3000
- Waage : Kern ALJ 220-4NM
- Rotationsverdampfer: Büchi RE 111 Rotavapor

2.2 Methoden

2.2.1 Auswirkungen von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide in lyophilisierten *Allium-cepa*-Proben

2.2.1.1 Synthese der Cysteinsulfoxidstandards

Das (+)-Alliin und das (+)/(-)-Methiin, die als Standard benutzt worden sind, wurden unten beschriebener Methode hergestellt. Diese Cysteinsulfoxide wurden von Herrn Brauschke synthetisiert. Die Synthese erfolgte nach Keusgen [15].

Die Synthese wurde folgendermaßen durchgeführt: In einem Rundkolben von 1000 L wurde vorsichtig 500 mL Ethanol mit 9,7 g Natrium vermischt. Hierzu wurden 26,6 g von gemörserten L-Cystein gegeben und 0,22 mol des gewünschten Alk(en)yl-bromids danach zugetropft. Die Mischung wurde bis 25°C abgekühlt und mit Eisessig bis ca. pH 5,5 eingestellt, damit das gewünschte S-Alk(en)yl-L-cystein auskristallisierte. Die Kristallisation erfolgte über 12 Stunden bei 20°C. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Ethanol mehrmals gewaschen. Dann wurde der Rückstand in einem bestimmten Volumen an Essigsäure bei 70°C rückgelöst. Dann wurde der 10-fache Überschuss an Aceton hinzugegeben. Nach 48 Stunden war die Kristallisation abgeschlossen und die Kristalle wurden abfiltriert. Das S-Alk(en)yl-L-cystein wurde oxidiert. Hierfür wurden 0,13 mol das S-Alk(en)yl-L-cystein in 180 ml Wasser zurückgelöst. Danach wurde die Lösung langsam mit 15,2 ml 25%-iger Wasserstoffperoxid (0,13 ml) gemischt. Die Reaktion erfolgte über 24 Stunden

bei Raumtemperatur und unter ständigem Rühren. Der Rückstand wurde dann abfiltriert.

2.2.1.2 Boratpuffer (0,05 M) pH 9,5

Es wurden 8,55 g Natriumdihydrogenphosphat und 4,49 g Dinatriumhydrogenphosphat in einen 2000 mL Becherglas mit 1800 mL Millipore Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5M-Natronlauge oder mit Phosphorsäure, wenn nötig, auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung quantitativ in einen 2000 mL Messkolben überführt und mit Millipore Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

2.2.1.3 Phosphatpuffer (50 mM) pH 6,5

Es wurden 8,55 g Natriumdihydrogenphosphat und 4,49 g Dinatriumhydrogenphosphat in einen 2000 mL Becherglas mit 1800 mL Millipore Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5M-Natronlauge oder mit Phosphorsäure, wenn nötig, auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung quantitativ in einen 2000 mL Messkolben überführt und mit Millipore Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

2.2.1.4 Ammoniumacetatpuffer (50 mM) pH 6,5

3,85 g Ammoniumacetat wurden in einen 1000 mL Becherglas mit 800 mL Millipore Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,2M-Essigsäure, wenn nötig, auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung quantitativ in einen 1000 mL Messkolben überführt und mit Millipore Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

2.2.1.5 OPA-Derivatisierungsreagenz

In einem 100 mL Becherglas wurden 140 mg *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) eingewogen. Unter Rühren wurden 5 mL Methanol (HPLC, rein) zugegeben. Es wurde so lange gewartet, bis das OPA vollständig gelöst war. Danach wurde unter dem Abzug unter starkem Rühren 200 µL 2-Methyl-2-propanthiol hinzu pipetiert. Anschließend wurden ebenfalls unter starkem Rühren langsam 50 mL Boratpuffer pH 9,5 zugegeben. Die Lösung musste vollkommen klar sein. Wenn

sie trüb war, wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung wurde in einer Braunglasflasche bei Raumtemperatur gelagert. Sie musste mindestens 12 Stunden vor Gebrauch hergestellt werden. Jeden zweiten Tag wurde sie erneut mit 200 µl 2-Methyl-2-propanthiol versetzt. Mit dieser Lösung wurde immer unter dem Abzug gearbeitet, weil das 2-Methyl-2-propanthiol einen äußerst penetranten Geruch besitzt.

2.2.1.6 Iodoacetamid Lösung (1 M)

185 mg Iodoacetamid wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß eingewogen. Und in 1 mL Methanol gelöst. Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.1.7 Mikroskopische Untersuchung der Lyophilisate

Um die Zellen zu quantifizieren und ihre Größe zu bestimmen, wurde bei der Mikroskopie eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Es wurden ungefähr 5 mg der lyophilisierten *Allium-cepa*-Probe, exakt gewogen, in ein Reaktionsgefäß von 1,5 mL gegeben. Dazu wurde 1 mL Millipore Wasser pipetiert. Das Gemisch wurde 30 Sekunden lang gründlich vermischt und die dann entstandene Lösung auf die Zählkammer pipetiert. Diese Proben wurden dann unter dem Mikroskope untersucht.

2.2.1.8 Probenextraktion und-vorbereitung für die HPLC-Messung

Es wurden ungefähr 30 mg, exakt gewogen, der lyophilisierte *Allium cepa*-Proben, in einen 20 mL Spitzkolben, der mit 2 mL Methanol befüllt wurde, überführt. Die Proben wurden für 10 Minuten (gerechnet ab Siedepunkt 65 °C) unter Rückfluss gekocht. Danach wurden 2 mL Millipore Wasser hinzugefügt und die Mischung erneut für 10 Minuten gekocht. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Die Temperatur des Wasserbads betrug 30 °C. Der Druck betrug anfangs 250 mbar und wurde danach langsam schrittweise bis auf 50 mbar verringert.

Zum Trockenextrakt wurden 4,93 mL OPA-Derivatisierungsreagenz und 50 µL 2-Methyl-2-propanthiol pipetiert. Diese Lösung wurde 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 20 µL Iodoacetamid hinzu pipetiert. Die Lösung wurde wieder drei Minuten vermischt. Danach wurde die Lösung durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und in ein HPLC-Probengefäß abgefüllt.

2.2.1.9 Methanolischer bzw. Wässriger Auszug und Probenvorbereitung für die HPLC-Messung

Es wurden ungefähr 30 mg, exakt gewogen, der lyophilisierten Probe in ein Reaktionsgefäß von 1,5 mL gegeben. 1 mL Methanol bzw. Millipore Wasser wurde hinzugefügt. Die Lösung wurde zwei Minuten gründlich vermischt und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß filtriert. In ein 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 250 µL von der Lösung und 730 µL vom OPA-Derivatisierungsreagenz hineinpipetiert. Diese Lösung wurde 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 20 µL Iodoacetamid hinzu pipetiert. Die Lösung wurde wieder 2 Minuten vermischt. Danach wurde die Lösung durch einen 0,45 µm Spitzenvorsatzfilter filtriert und in HPLC Probengefäße abgefüllt.

2.2.1.10 Probenvorbereitung für die Cochromatographie

Verschiedene Standardlösungen wurden zur Probe hinzugegeben, um mittels Cochromatographie schlecht aufgelöste Peak besser zuordnen zu können. Es wurden folgende Standards verwendet: Methiin, Threonin, Tyrosin, Phenylalanin, Alliin, Alanin, Glycin, Leucin und Isoleucin.

Von jedem Standard wurden ungefähr 10 mg in einen 10 mL Messkolben eingewogen und mit Millipore Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Dann wurden 250 µL dieser Standardlösung in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 730 µL OPA versehen. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 20 µL Iodoacetamid hinzu pipetiert. Die Lösung wurde 2 Minuten gemischt.

In eine weitere Probe, die nach Abschnitt 2.2.1.8 vorbereitet wurde, wurden je 50 μL der Standardlösungen mit Methiin, Glycin, Tyrosin und Phenylalanin pipetiert. Die Lösung wurde dann durch einen 0.45 μm Spritzenvorsatzfilter in ein HPLC Probengefäß filtriert.

Zwei weitere Proben wurden analog zu vorherigen Lösungen mit den Standards Threonin, Allin und Alanin bzw Isoleucin und Leucin versehen.

2.2.1.11 Kalibrationsgerade für die HPLC mit einem L-(+)-Alliin-Standard
Vom synthetisierten L-(+)-Alliin (s. Punkte 2.2.1.1) wurde eine Stammlösung vorbereitet. Dafür wurden 7.3 mg vom Alliin in ein Probengefäß eingewogen. Dazu wurden 1 mL Millipore Wasser pipetiert. Die Konzentration von dieser Lösung war 7300 mg/L. 100 μL von dieser Lösung wurden in ein HPLC Probengefäß gegeben. Dazu wurden 850 μL vom OPA-Reagent pipetiert. Nun wurde die Lösung für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden 50 μL Iodoacetamidlösung dazu pipetiert. Die Konzentration dieser Lösung, die Stammlösung, ist 730 mg/l. Ausgehend von der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3 : Verdünnungsteihe des Standard für die Kalibrationsgerade

Standardlösung	Volumen der Standardlösung [µL]	Volumen Millipore Wasser [µL]	Alliin Konzentration [mg/L]	Stoffmenge [mol]
1	500 µl Stammlösung	500	365	4.12E-08
2	250 µl Stammlösung	750	182.5	2.0596E-08
3	100 µl Standardlösung 1	900	36.5	4.12E-09
4	100 µl Standardlösung 2	900	18.25	2.06E-09
5	200 µl Standardlösung 3	800	7.3	8.24E-10
6	200 µl Standardlösung 4	800	3.65	4.12E-10

Jede Standardlösung wurde durch einen 0.45 µm Filter filtriert und in HPLC-Probengefäße überführt.

2.2.1.12 HPLC-Messungen

Die HPLC-Methode wurde in der Arbeit von Schmidt [36] und nachher in einer Shimadzu LC-4a HPLC-Anlage in der Arbeit von Jedelská [37] validiert. Später wurde diese Methode teilweise im Merck Hitachi D-7000 LaChrom HPLC-Anlage in der Arbeit von Kusterer [38] validiert.

Es wurden folgende Parameter bei der HPLC-Trennung verwendet:

- Temperatur : 30 °C
- Injektionsvolumen : 20 µL
- Mobile Phase : A : Acetonitril, B: Phosphatpuffer
- Flussrate : 1 mL/min
- Detektion : UV; Wellenlänge : 334 nm
- Analysenzeit : 85 min
- Gradient : nach Tabelle 4

Tabelle 4 : Lösungsmittel-Gradient bei der HPLC-Messung

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	20	80
20	20	80
49	23	77
50	23	77
54	27	73
55	27	73
63	30	70
65	35	65
75	35	65
75.1	20	80
85	20	80

2.2.1.13 HPLC/MS-Messungen

Die HPLC/MS-Messung wurde durchgeführt, um die verschiedenen Peaks einer Substanz zuordnen zu können.

Es wurden folgende Parameter bei der HPLC-Trennung verwendet:

- Temperatur : 30 °C
- Injektionsvolumen : 20 µl
- Mobile Phase : A : Acetonitril, B: Ammoniumacetatpuffer
- Flussrate : 0,25 ml/min
- Detektion : UV; Wellenlänge : 334 nm
- Analysenzeit : 81 min
- Gradient : nach Tabelle 5

Tabelle 5 : Lösungsmittel-Gradient Programm für die HPLC/MS-Messung

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	23	77
20	23	77
49	26	74
50	26	74
54	30	70
55	30	70
63	33	67
65	33	67
65.01	41	59
70	41	59
81	41	59
81.01	23	77

Die Parameter für die MS-Messung bei positiver Ionisation sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 : Parameter für die MS

Parameter	Einstellung
Curtain gas (CUR)	25
Ion spray voltage (IS)	5500 V
Temprature (TEM)	300 °C
Gas 1 (nebulizer gas)	25
Gas 2 (turbo gas)	-
Interface heater (Ihe)	ON
Declustering potential (DP)	55 V
Entrance potential (EP)	9 V
Messbereich	50-1000 amu

2.2.2 Strukturaufklärung von 2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfanyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure aus *Allium rubellum*

2.2.2.1 Ammoniumacetatpuffer (50 mmol) pH 6,5

7,7 g Ammoniumacetat wurden in einen 2000 mL Becherglas in 1800 mL Millipore Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,2M Essigsäure auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung quantitativ in einen 2000 mL Messkolben überführt und mit Millipore Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

2.2.2.2 Extrakterstellung

Ungefähr 1 g einer Zwiebel von *Allium rubellum* wurde exakt gewogen und in einen 250 mL Rundkolben, der mit 20 mL Methanol befüllt wurde, überführt. Die Probe wurde für 10 Minuten (gerechnet ab Siedepunkt 65 °C) unter Rückfluss am Rückflusskühler gekocht. Danach wurde die Lösung bis 30 °C abgekühlt. Die Probe wurde danach in einen Mörser überführt und zerkleinert. Anschließend wurde die zerkleinerte Zwiebel wieder in den Rundkolben gegeben. Der Mörser

und das Pistill wurden mehrmals mit Methanol abgespült, bis keine Rückstände verblieben. Die Probe wurde wieder unter Rückfluss gekocht. Sobald der Siedepunkt erreicht war, wurden langsam 20 mL Millipore Wasser hinzugefügt und die Mischung für 10 Minuten gekocht. Danach wurde das Gemisch mit einem Faltenfilter in einem neuen Rundkolben filtriert. Die beiden Filtrationlösungen wurden in einem einzigen Kolben gemischt wobei unter Verwendung des Rotationsverdampfers das Methanol-Wassergemisch herausdestilliert wurde. Die Temperatur des Wasserbads betrug 30°C. Der Druck betrug anfangs 250 mbar und wurde danach langsam schrittweise bis auf 50 mbar verringert.

2.2.2.3 Probenvorbereitung zur präparativen HPLC

In einen Rundkolben *Allium-rubellum*-Extrakt wurden 4,93 mL OPA-Reagenz und 50 µL 2-Methylpropanthiol pipetiert. Der Rundkolben wurde 30 Minuten im Dunklen inkubiert und anschließend 20 µL Iodoacetamid in der Rundkolben pipetiert. Die Probe war jetzt bereit für die HPLC-Messung und die präparative HPLC-Trennung.

2.2.2.4 Probenvorbereitung für die MS-Messungen

Um ein Probe ohne OPA-Derivatisierung am Massenspektrometer zu messen, wurde ungefähr 1 g einer Zwiebel von *Allium rubellum* eingewogen. Die Extraktionsmethode war dieselbe wie oben beschrieben. Nach dem Einrotieren wurde die Probe wieder in 5 mL Methanol gelöst und mit der MS vermessen.

2.2.2.5 Parameter für die präparative HPLC

Es wurden folgende Parameter bei der präparativen Trennung verwendet:

- Temperatur : nicht reguliert
- Injektionsvolumen : 1000 μ L
- Mobile Phase : A : Acetat-Puffer , B : Methanol
- Fluss : 10 ml/min
- Detektion : UV; Wellenlänge : 334 nm
- Analysenzeit : 60 min
- Gradient : nach Tabelle 7

Tabelle 7 : Gradient für die präparative HPLC-Trennung

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	60	40
10	60	40
15	40	60
60	40	60

Das Chromatogramm der präparativen HPLC-Trennung befindet sich im Anhang 7.28. Der Peak bei 34 Minuten wurde in einem 250 mL Rundkolben gesammelt.

2.2.2.6 Messungen am Massenspektrometer

Die Fraktion, die durch die präparative HPLC getrennt und aufgefangen wurde, wurde bis zur vollständigen Trocknung eingengt. Danach wurde der Rückstand in 5 mL Methanol zurückgelöst. 1 mL dieser Lösung wurde dann durch einen 0.2 μ m Filter in ein Vial filtriert. Diese Lösung wurde dann mit einer 500 μ L Spritze aufgezogen und dann direkt in den Massenspektrometer injiziert. Die Flussrate betrug 20 μ L/min. Die verschiedenen Parameter für die MS-Messungen bei positiver Ionisation werden in Tabelle 8 bei negativer Ionisation in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 8 : MS Parameter bei positiv Ionisation

Parameter	Einstellung
Curtain gas (CUR)	10
Ion spray voltage (IS)	5500 V
Temperature (TEM)	300 °C
Gas 1 (nebulizer gas)	20
Gas 2 (turbo gas)	-
Interface heater (Ihe)	ON
Declustering potential (DP)	110 V
Entrance potential (EP)	10 V
Messbereich	30-500 amu

Tabelle 9 : MS Parameter bei negativ Ionisation

Parameter	Einstellung
Curtain Gas (CUR)	-10
Ion Spray Voltage (IS)	-4500 V
Temperature (TEM)	300 °C
Gas 1 (nebulizer gas)	20
Gas 2 (turbo gas)	-
Interface Heater (Ihe)	ON
Declustering Potential (DP)	-110 V
EntrancePotential (EP)	-10 V
Messbereich	30-500 amu

Die Parameter für die Analyse mittels MS/MS bei positiver Ionisation werden in Tabelle 10 und bei negativer Ionisation in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 10 : MS/MS Parameter bei positiver Ionisation

Parameter	Einstellung
Collision Activated Dissociation Gas (CAD)	1
Cell Entrance Potential (CEP)	25.70
Collision Energy (CE)	32
Cell Exit Potential (CXP)	3

Tabelle 11 : MS/MS Parameter bei negativer Ionisation

Parameter	Einstellung
Collision Activated Dissociation Gas (CAD)	1
Cell Entrance Potential (CEP)	-16.80
Collision Energy (CE)	-50
Cell Exit Potential (CXP)	-3

2.2.2.7 FT-IR

Ein Teil der bis zur Trockene eingeeengten Fraktion, die mittels präparativer HPLC gewonnen wurde, wurde mittels FT-IR gemessen.

2.2.2.8 NMR Methode

Die Lösungen, die für die Messungen mit MS und FT-IR verwendet wurden, wurden mit dem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Danach wurde der Rückstand in 500 μL deuteriertem Methanol zurückgelöst. 500 μL wurden in einem NMR-Röhrchen überführt. Der Rundkolben wurde noch einmal mit 200 μL deuteriertem Methanol gespült und dieses Volumen ebenfalls in das NMR-Röhrchen überführt.

Es wurden mehrere Messungen mit ^1H , ^{13}C , HH-COSY und HMQC durchgeführt. Die verschiedenen Parameter für diese Analyse sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Die Messungen wurden unter Raumtemperatur vollzogen. Der verwendete Probenkopf hat die Typenbezeichnung: 40TH5AT/FG2D Autotune.

Tabelle 12 : Parameter für die NMR Messung

Analyse	Frequenz [MHz]	Relaxationszeit [s]	Anzahl der Scans
^1H	400	1,5	16
^{13}C	100	1,5	2048
HH-COSY	400	1,5	4
HMQC	400	1,5	6

3 Resultate

3.1 Auswirkungen von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide in *Allium cepa*

Nach Extraktion und HPLC-Messungen konnten die Inhaltsstoffe aus *Allium cepa* quantifiziert werden. Anschließend wurden t-Tests durchgeführt um den Einfluss der verschiedenen Lagerungsbedingungen auf die Menge an Inhaltsstoffen zu überprüfen.

3.1.1 Probenvorbereitung

3.1.1.1 Proben

Zu Beginn der Arbeit wurden die 24 lyophilisierten Proben von *A. cepa* „Copra“ mikroskopiert um auf die optimale Probenvorbereitung zu schließen. Durch Mikroskopie sollte geklärt werden, ob die Zellen der Zwiebelproben noch intakt sind. Die Pflanzenzellen haben eine Größe von ca. 35 µm. Die Pflanzenzellfragmente waren zwischen 2 und 16 µm groß (s. Abbildung 10). In den verschiedenen Proben waren nur wenige intakte Zellen vorhanden. Die Zellenkonzentration, die in verschiedenen lyophilisierten Proben ermittelt wurde, ist in Tabelle 13 aufgelistet.

Resultate

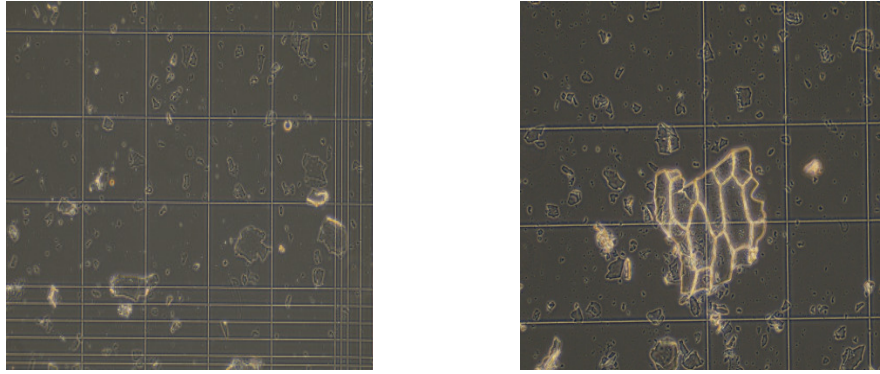


Abbildung 10 : Mikroskopische Bilder der lyophilisierten Proben

Tabelle 13 : Zellenkonzentration in verschiedenen lyophilisierten Zwiebelproben

Probe	Zellenkonzentration [Anzahl Zellen/mg]
KOI 3	590
KOI 9	930
KOII 1	1400
KOII 4	880
KOII 5	430
KOII 9	530
E 10	1400

Es ergibt sich ein Mittelwert von 880 ± 398 Zellen/mg Lyophilisat.

3.1.1.2 Probenauszug mit Wasser

Durch die Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass fast alle Zellen zerstört sind. Es war daher nicht unbedingt nötig eine Extraktion durchzuführen. Am Anfang der Arbeit wurde die Probenvorbereitung mit Wasser durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.1.9). Danach wurden die Proben durch HPLC gemessen (s. Abschnitt 2.2.1.12). Es resultierte ein HPLC-Chromatogramm (s. Abbildung 11). Jedoch konnte kein Isoallin nachgewiesen werden. Das Isoallin sollte ungefähr eine Minute vor Tyrosin eluiert werden. Aus diesem Grund, gingen diese Chromatogramme nicht in die Auswertung ein.

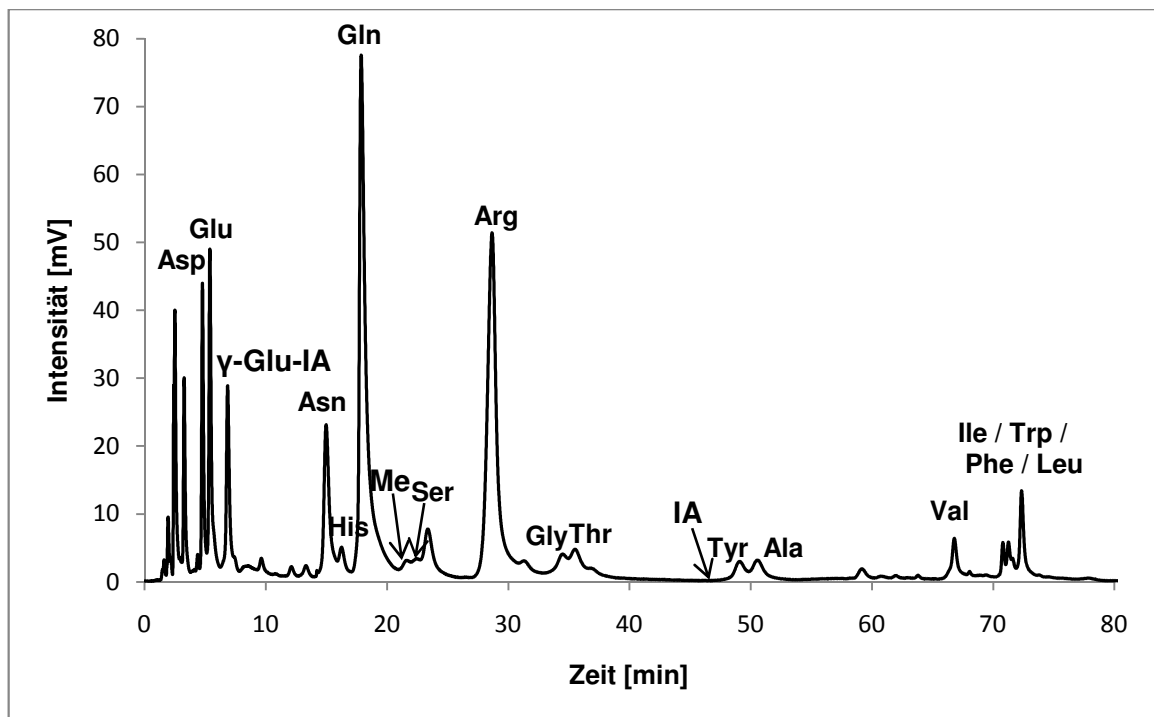


Abbildung 11 : Chromatogramm des wässrigen Auszuges (Probe KOII 4)

3.1.1.3 Probenauszug mit Methanol

Nach einem Auszug mit Methanol ergaben die HPLC-Chromatogramme (s. Abbildung 12), dass Isoalliin erkennbar ist und quantifiziert werden kann. Dieses Chromatogramm bietet eine gute Auflösung der meisten Aminosäuren und Cysteinsulfoxide.

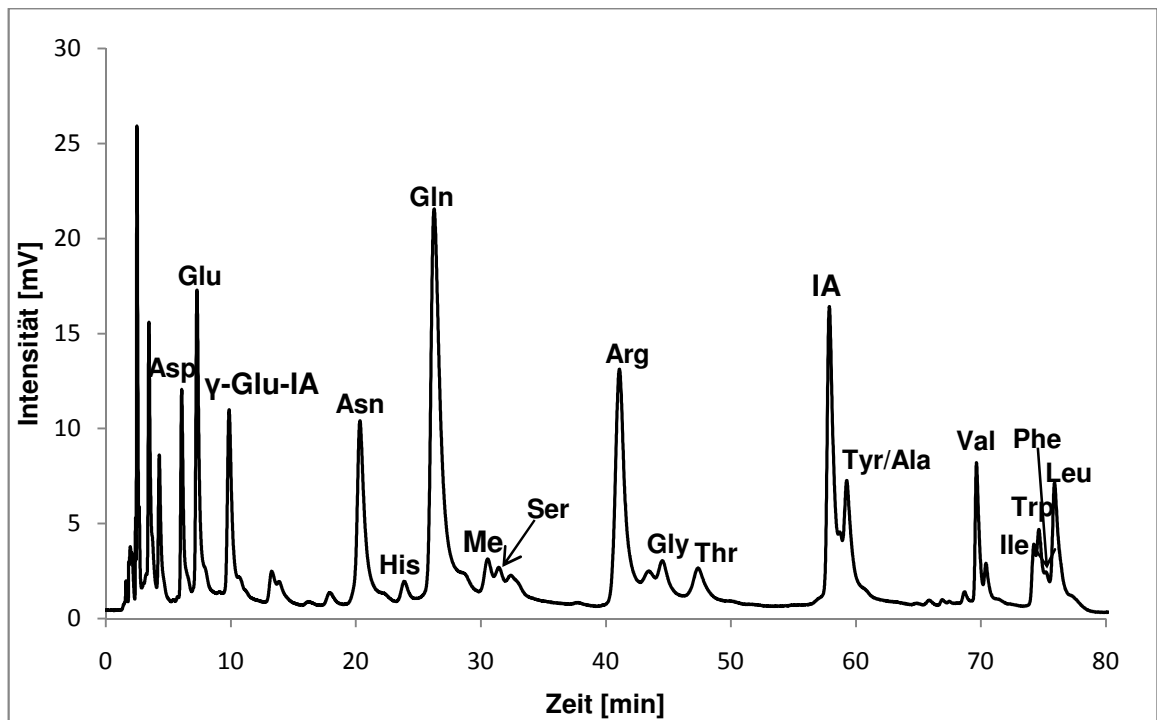


Abbildung 12 : Chromatogramm des methanolischen Auszuges (Probe KOII 7)

3.1.1.4 Probenextraktion

Vier Extraktionen nach Abschnitt 2.2.1.8 wurden durchgeführt um sicher zu sein, dass mit dem methanolischen Auszug die Aminosäuren und Cysteinsulfoxide quantitativ extrahiert wurden. Ein Beispiel Chromatogramm von die HPLC-Messung des Extrakts ist in Abbildung 13 zu sehen.

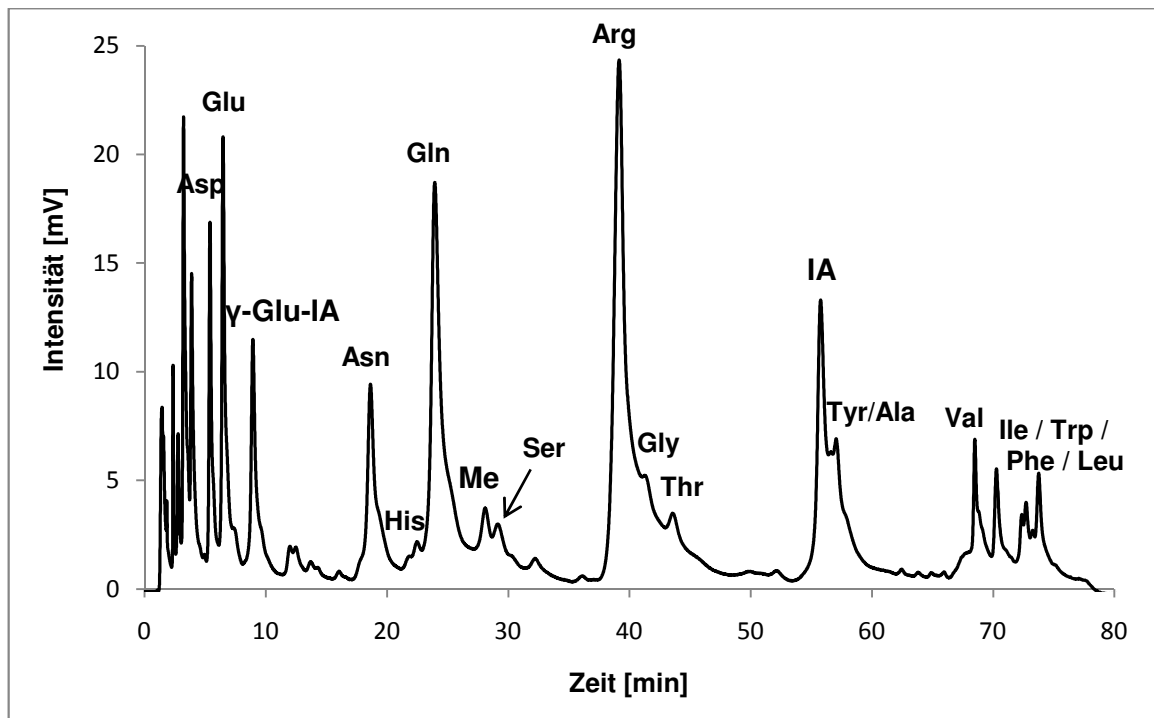


Abbildung 13 : Chromatogramm einer Extraktion (Probe KOII 4)

Die Quantifizierung ergab eine abweichende Menge an Aminosäuren und Cysteinsulfoxide im Vergleich zum methanolischen Auszug. Das Chromatogramm solch eines Extraktes liefert jedoch eine schlechtere Trennung der Amminosäuren und Cysteinsulfoxide. Zudem ergab sich ein höheres Hintergrundrauschen. Eine wichtige Beobachtung war auch, dass die Menge an Isoalliin mit dem methanolischen Auszug fast doppelt so groß war. Aus diesen Gründen wurde entschieden den methanolischen Auszug zu verwenden.

Da nur die Extraktion nach Abschnitt 2.2.1.8 validiert war, wurde für jede Aminosäure und Cysteinsulfoxid ein Faktor bestimmt, der sich aus der Quantifizierung nach beiden Methoden ergab (s. Tabelle 14). Die

Standardabweichung ist in den meisten Fällen sehr klein. Das bedeutet, dass der Auszug mit Methanol reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Tabelle 14 : Quantifizierungsfaktor zum Vergleich zweier Methoden

Aminosäuren und Cysteinsulfoxide	Faktor Mittelwert	Standardabweichung
Aspartat	1,71	0,17
Glutamat	1,05	0,08
γ-Glutamyl-Isoalliin	1,15	0,09
Asparagin	1,25	0,14
Histidin	1,07	0,10
Glutamin	0,84	0,05
Methiin	1,15	0,28
Serin	1,30	0,63
Arginin	2,27	0,54
Threonin	1,75	0,26
Glycin	2,09	0,49
Isoalliin	0,60	0,06
Tyrosin/Alanin	0,89	0,16
Valin	0,94	0,12
Tryptophan	1,10	0,36
Isoleucin	0,99	0,27
Phenylalanin	1,07	0,19
Leucin	0,81	0,19

Der Faktor wurde folgend bestimmt: den Prozentmassenanteil von der Extraktion wurde durch der Prozentmassenanteil von dem methanolischen Auszug geteilt.

3.1.1.5 HPLC-Messungen

Die 24 Proben, die mittels Methanol ausgezogen wurden, wurden mit der HPLC gemessen (s. Abschnitt 2.2.1.12). Jede Probe wurde dreimal nacheinander gemessen. Durch den Vergleich mit den Daten von der HPLC-MS (s. Abbildung 14 und Anhang 7.1) konnten die Signale den Aminosäuren und Cysteinsulfoxiden zugeordnet werden. Zwei weitere HPLC-Chromatogramme, jeweils eines der Reihe KOII und E, befinden sich im Anhang 7.2 und 7.3.

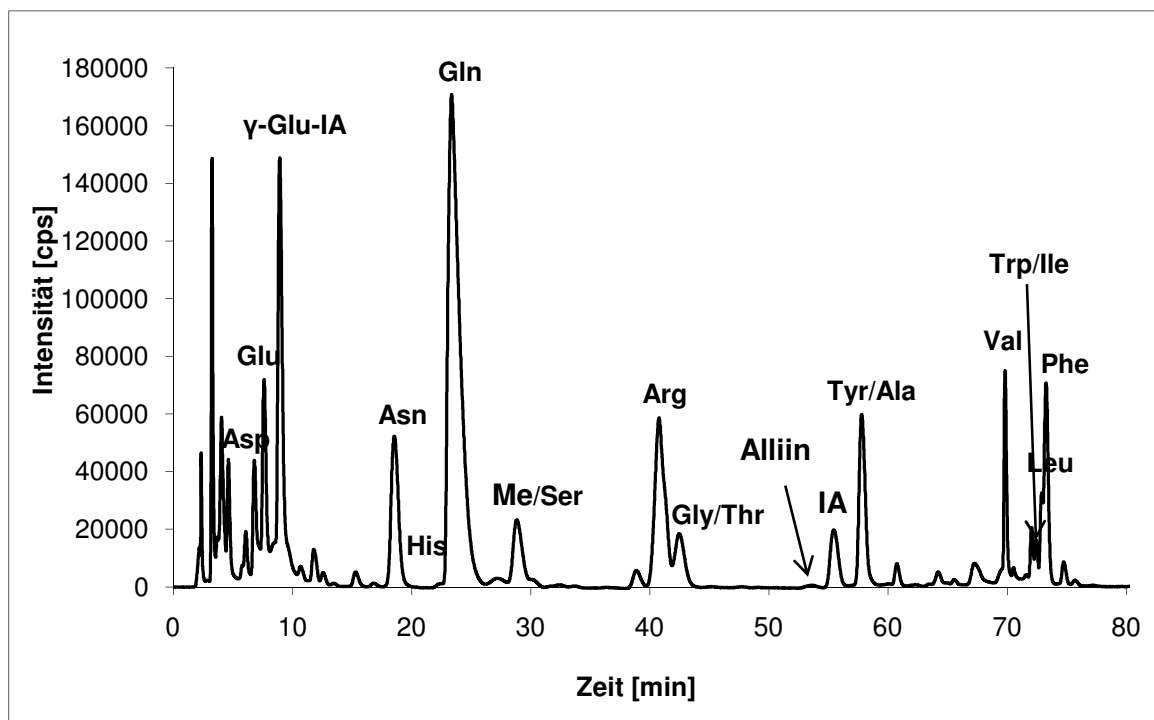


Abbildung 14 : Chromatogramm einer HPLC-MS-Messung (KOI 1)

Trotz HPLC-MS-Analyse war die Zuordnung in einigen Fällen schwierig, da einige Peaks nicht gut aufgelöst waren (Methiin/Serin; Threonin/Glycin; Alanin/Tyrosin) oder bestimmte Stoffe dieselbe Masse besitzen (Alliin/Isoalliin, Isoleucin/Leucin). Zur Bestimmung wurden die Standards zur Probe hinzugegeben (s. Abschnitt 2.2.1.10 und Chromatogramme Anhang 7.4-7.7). Damit war es möglich, die verschiedenen Peaks den Inhaltsstoffen zuzuordnen.

Bei der Analyse mittels HPLC-MS war Alliin zwar zu erkennen, mit der HPLC-Analyse lag es jedoch unter der Bestimmungsgrenze. Diese liegt bei $2 \cdot 10^{-5} \%$ [38]. Tyrosin und Alanin wurden in manchen Chromatogrammen bei der HPLC-Analyse nicht vollständig aufgelöst, daher wurden sie zusammen quantifiziert. Je nach Methode (HPLC und HPLC-MS) gab es für zwei Aminosäuren eine unterschiedliche Elutions-Reihenfolge:

HPLC : 1. Isoleucin, 2. Phenylalanin, 3. Leucin

HPLC-MS : 1. Isoleucin, 2. Leucin, 3. Phenylalanin

3.1.2 Kalibrationsgerade mit L-(+)-Alliin

Die Kalibrationsgerade wurde mit synthetischem L-(+)-Alliin ermittelt (s. Abbildung 15). Diese Kalibrationkurve ermöglicht es die Aminosäuren und Cysteinsulfoxide in ihrer Stoffmenge zu quantifizieren. Danach wurden die Stoffmengen in Massen umgerechnet und als prozentuale Massenanteile bestimmt.

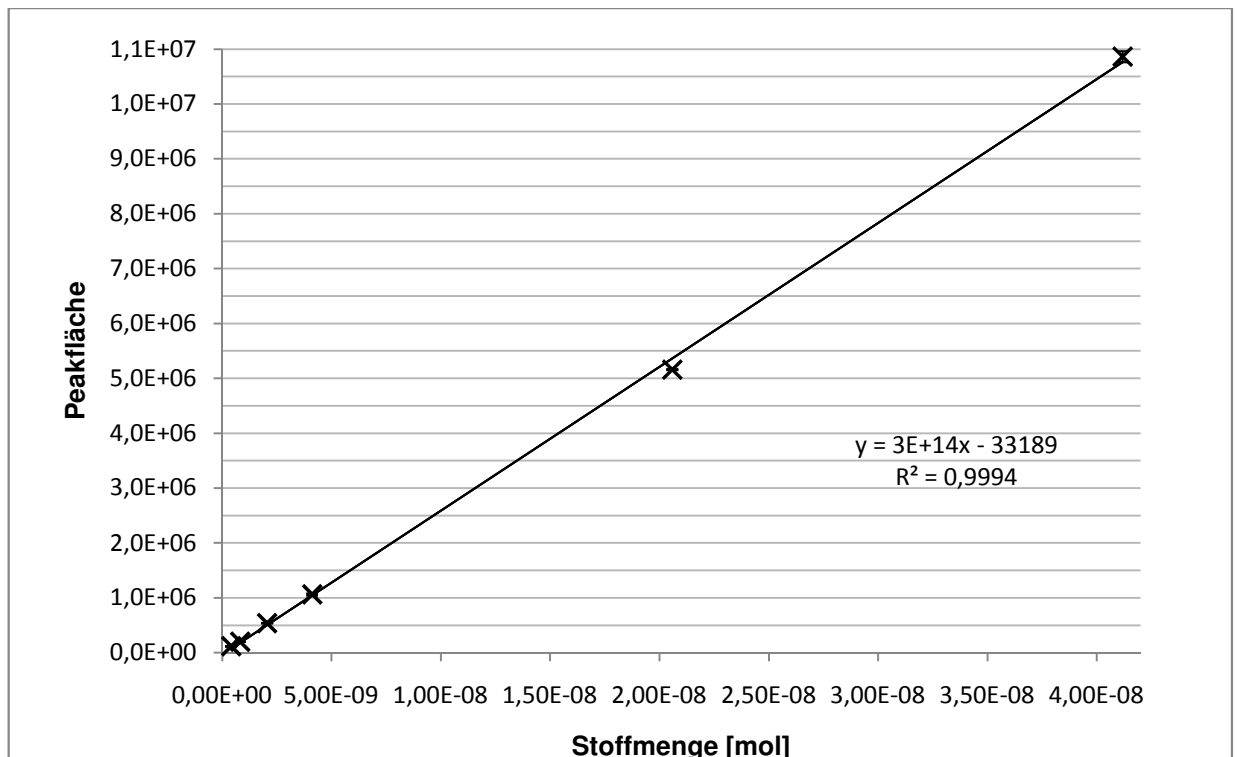


Abbildung 15 : Kalibrationsgerade mit L-(+)-Alliin

3.1.3 Quantifizierung durch HPLC-Analyse

Für jede Aminosäure und jedes Cysteinsulfoxid sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeder Reihe (KOI, KOII, E) in den Abbildungen 16-19 dargestellt.

Für Aspartat, Glutamat, Histidin, Methiin, Serin, Threonin, Glycin und Tryptophan ergab sich, dass die zwei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen (KOII und E) im Mittelwert keinen Unterschied bewirken (s. Abbildung 16). Lediglich die Standardabweichung differiert bei den beiden Reihen. Sie ist ein Maß für die interindividuellen Unterschiede der Zwiebelproben.

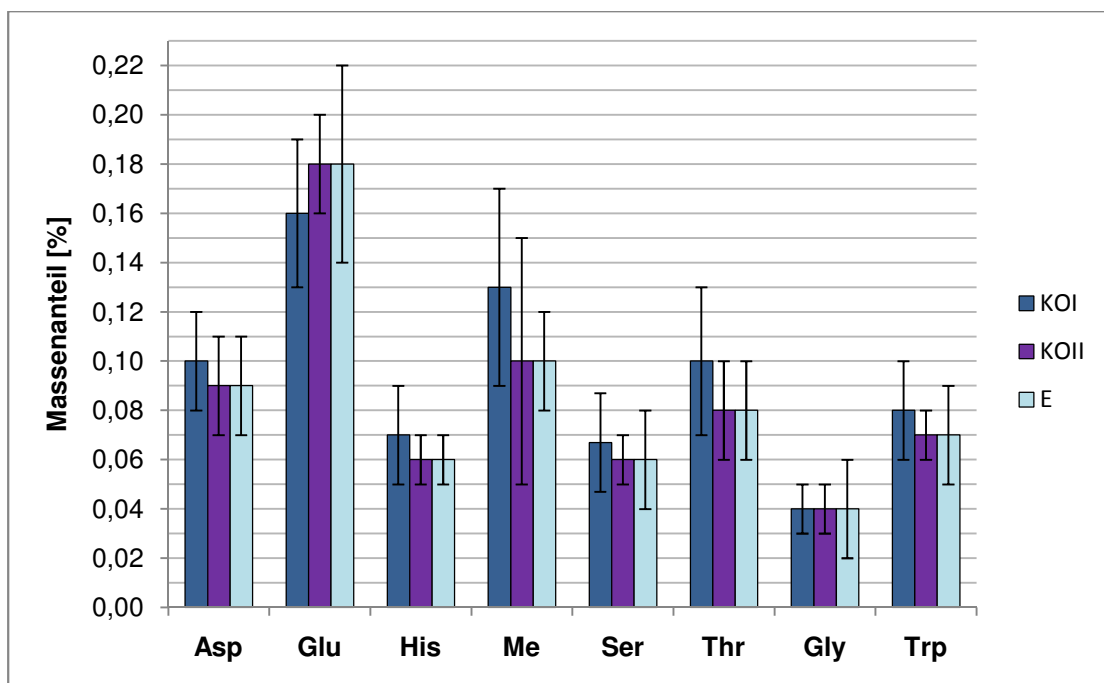


Abbildung 16 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe I

Resultate

Für Asparagin, Glutamin, Arginin, Isoalliin und Tryrosin/Alanin ergeben sich kleine Unterschiede durch die Lagerung mit Luft bzw. Ethylen (s. Abbildung 17).

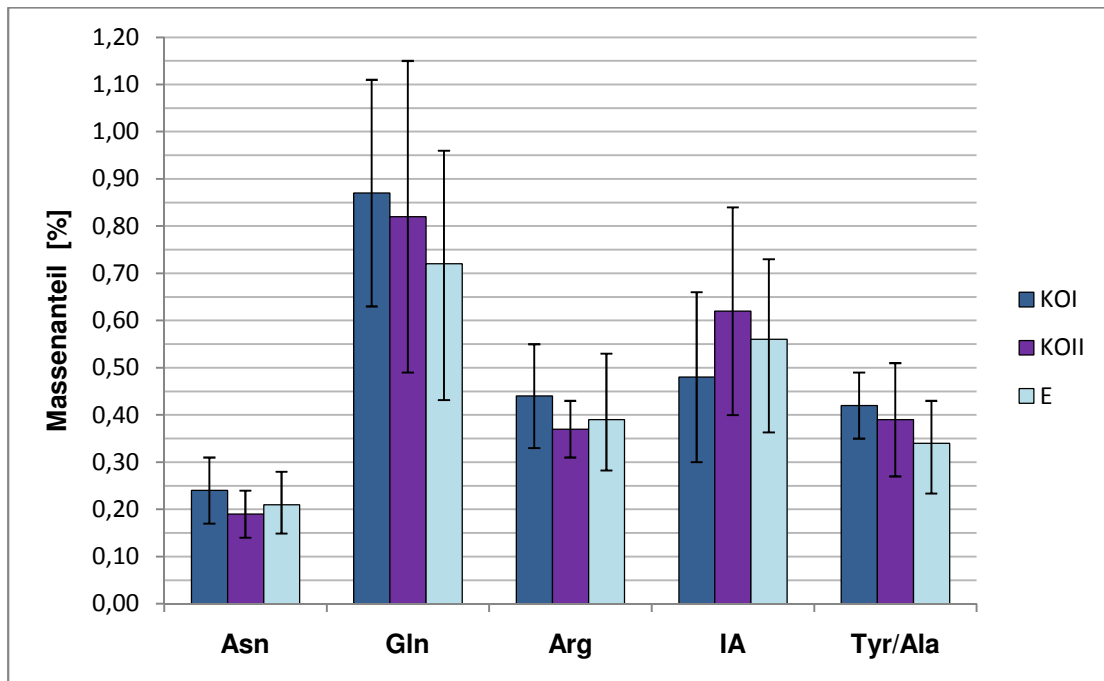


Abbildung 17 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe II

Bei Valin, Isoleucin, Phenylalanin, Leucin und γ -Glutamyl-Isoalliin (s. Abbildung 18 und 19) ist auf der Darstellung ebenfalls ein Unterschied zwischen den drei Reihen zu erkennen. Der größte Unterschied ist bei γ -Glutamyl-Isoalliin und Leucin festzustellen.

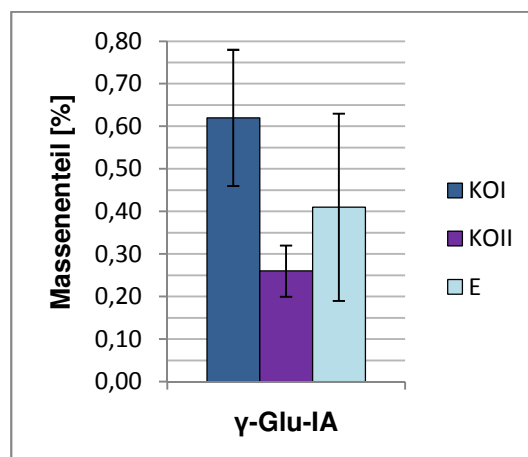


Abbildung 18 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe III

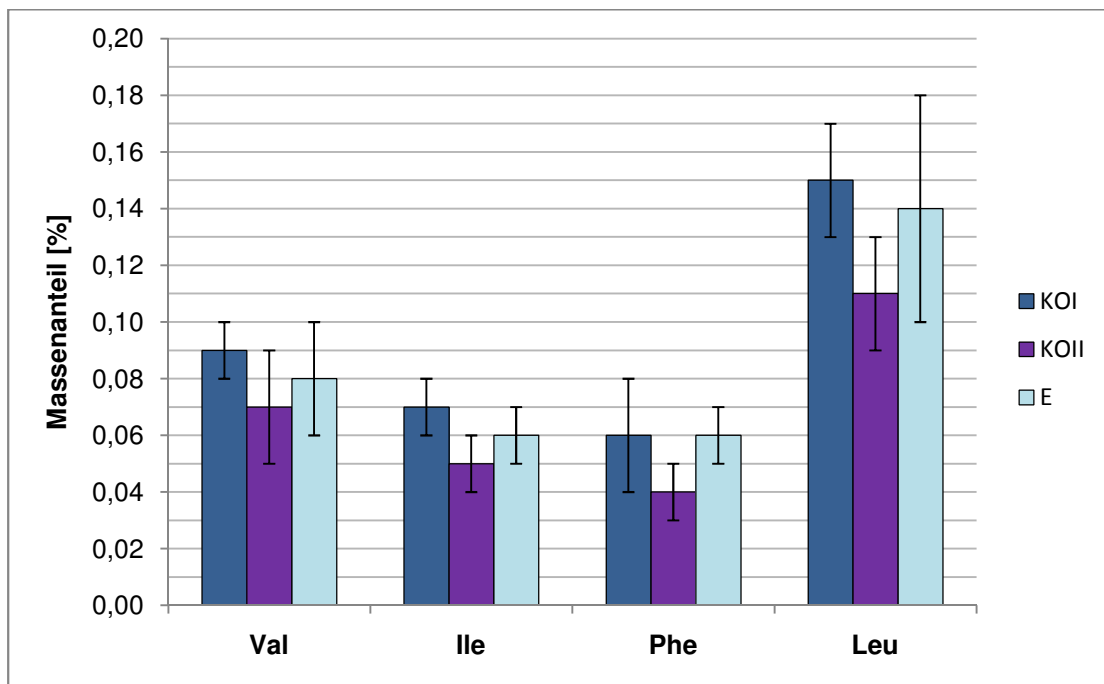


Abbildung 19 : Massenanteile ausgewählter Zwiebelinhaltsstoffe IV

Alle Mittelwerte und Standardabweichungen von jeder Aminosäure und jedem Cysteinsulfoxid der Versuchsreihen sind in Tabelle 15 wiedergegeben.

Resultate

Tabelle 15 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide für die Kontrolle und zwei Lagerungsbedingungen

Aminosäuren/ Cysteinsulfoxide	Mittelwert der Reihe KOI [%]	Stdabw. der Reihe KOI [%]	Mittelwert der Reihe KOII [%]	Stdabw. der Reihe KOII [%]	Mittelwert der Reihe E [%]	Stdabw. der Reihe E [%]
Asparaginsäure	0,10	0,02	0,09	0,02	0,09	0,02
Glutaminsäure	0,16	0,03	0,18	0,02	0,18	0,04
Histidin	0,07	0,02	0,06	0,01	0,06	0,01
Methiin	0,13	0,04	0,10	0,05	0,010	0,02
Serin	0,07	0,02	0,06	0,01	0,06	0,02
Threonin	0,10	0,03	0,08	0,02	0,08	0,02
Glycin	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,02
Tryptophan	0,08	0,02	0,07	0,01	0,07	0,02
Asparagin	0,24	0,07	0,19	0,05	0,21	0,07
Glutamin	0,87	0,24	0,82	0,33	0,72	0,24
Arginin	0,44	0,11	0,37	0,06	0,39	0,14
Isoalliin	0,48	0,18	0,62	0,22	0,56	0,17
Tyrosin/Alanin	0,42	0,007	0,39	0,12	0,34	0,09
Valin	0,09	0,01	0,07	0,02	0,08	0,02
Isoleucin	0,07	0,01	0,05	0,01	0,06	0,01
Phenylalanin	0,06	0,02	0,04	0,01	0,06	0,01
Leucin	0,15	0,02	0,11	0,02	0,14	0,04
γ -Glutamyl-Isoalliin	0,62	0,16	0,26	0,06	0,41	0,22

3.1.4 Statistische Ergebnisse

Anschließend wurde t-Tests durchgeführt. Der Mittelwert der drei HPLC-Messungen wurde für die acht Zwiebelproben berechnet. Danach wurde der Mittelwert der Mittelwerte der drei Reihen (Kontrolle, Luft und Ethylen) berechnet. Als Gesamtergebnis ergibt sich so für jede Reihe ein Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung. Beim t-Test wurden dann die verschiedenen Reihen miteinander verglichen (Kontrolle mit Luft, Luft mit Ethylen und Ethylen mit Kontrolle). Es wurden darauf folgend die Ergebnisse des t-Tests betrachtet, um zu sehen, ob die verschiedenen Lagerungsbedingungen einen statistisch signifikanten Effekt bezüglich der Menge an Inhaltsstoffen ausübt.

Die Resultate von den Messungen des t-Tests für jede Aminosäure und jedes Cysteinsulfoxid sind im Anhang 7.8-7.25 aufgelistet.

Für den t-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5 \%$ liegt das Signifikanzniveau bei 2.36. Die Resultate des t-Tests sind für Aspartat, Glutamat, Histidin, Methiin, Serin, Threonin, Glycin und Tryptophan gleich. Diese Ergebnisse zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen Lagerungsbedingungen und die Kontrolle für alle untersuchten Aminosäuren und das Cysteinsulfoxid gibt (s. Anhang 7.8-7.25). Dieses Ergebnis und der Graph (s. Abbildung 16) zeigen, dass die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen keinen signifikanten Effekt auf die untersuchten Zwiebelinhaltsstoffe ausüben.

Abbildung 17 zeigt geringe Unterschiede für Asparagin, Glutamin, Arginin, Isoalliin und Tryrosin/Alanin. Dieses Ergebnis ließ sich durch den t-Test nicht bestätigen. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Reihen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von α beträgt 5 %. Die Auswertung ergab, dass der sich optisch im Graphen zeigende Unterschied statistisch nicht signifikant ist.

Bei Valin gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den Reihen KOI und KOII (berechneter t-Wert: 2,53) aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Reihen KOI und E (berechneter t-Wert: 1,26) und auch nicht zwischen den Reihen KOII und E (berechneter t-Wert: 1,00). Für Isoleucin gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen KOI und KOII (berechneter t-Wert: 4,00) aber keinen zwischen KOI und E (berechneter t-Wert: 2,00) und zwischen KOII und E (berechneter t-Wert: 2,00). Es gibt einen signifikanten Unterschied bei Phenylalanin zwischen den Reihen KOI und KOII (berechneter t-Wert: 2,36) und zwischen KOII und E (berechneter t-Wert: 4,00), aber keinen signifikanten Unterschied zwischen KOI und E (berechneter t-Wert: 0,00). Leucin betrachtend gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen KOI und KOII (berechneter t-Wert: 4,00) aber keinen signifikanten Unterschied zwischen KOI und E (berechneter t-Wert: 0,63) und zwischen KOII und E (berechneter t-Wert: 1,90). Für die γ -Glutamyl-Isoalliin gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den Reihen KOI und KOII (berechneter t-Wert: 5,96), aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Reihen KOI und E (berechneter t-Wert: 2,18) und auch nicht zwischen den Reihen KOII und E (berechneter t-Wert: 1,86).

3.2 Strukturaufklärung Strukturaufklärung von 2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfanyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure aus *Allium rubellum*

Der Zwiebelextrakt aus *A. rubellum* (s. Abschnitt 2.2.2.2) wurde nach Derivatisierung mit OPA zuerst durch HPLC nach derselben Methode, die auch für die Bestimmung der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide verwendet wurde, aufgetrennt. Das unbekannte Dipeptid befand sich bei dem Signal von 25 Minuten (s. Chromatogramm im Anhang 7.26). Die Quantifizierung ergab, dass der Massensanteil im Extrakt 0.82 % betrug.

Um die Struktur dieses Dipeptides aufzuklären, musste es zuerst isoliert werden. Dies geschah mittels präparativer HPLC nach OPA-Derivatisierung. Die Strukturaufklärung wurde im Anschluss mittels FT-IR-MS-NMR-Methoden durchgeführt.

3.2.1 Struktur des Dipeptids

Abbildung 20 zeigt die Struktur von 2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfanyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure (γ -Glutamyl-desoxo-methiin) abgebildet und Abbildung 21 dasselbe Molekül nach OPA-Derivatisierung.

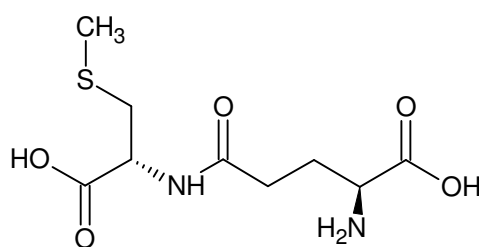


Abbildung 20 : Struktur von γ -Glutamyl-desoxo-methiin

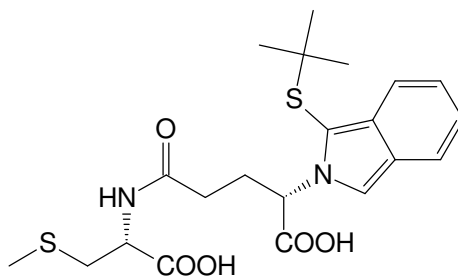


Abbildung 21 : Struktur von γ -Glutamyl-desoxo-methiin nach OPA-Derivatisierung

3.2.2 Präparative HPLC und UV-Spektrum

Die verschiedenen Fraktionen wurden gesammelt (s. Anhang 7.27). Der große Peak bei 34 Minuten ist das Signal des Dipeptides.

Das UV-Spektrum dieses OPA-derivatisierten Dipeptides zeigte mehrere Absorptionmaxima. Sie liegen bei 254 und 335 nm (s. Anhang 7.28).

3.2.3 Charakterisierung durch FT-IR

Bei der Analyse des OPA-derivatisierten Dipeptides mittels FT-IR ergaben sich einige Absorptionsbanden unterschiedlicher Intensität (s. Anhang 7.29 und Tabelle 16).

Tabelle 16 : IR-Banden der Funktionellen Gruppen von γ -Glutamyl-desoxo-methiin

Funktionelle Gruppe	Allgemeiner Absorptionsbereich [cm⁻¹]	Schwingungstyp	Intensität	Aufgetretene Absorption Maximal [cm⁻¹]
Carbonsäure				
C=O	1700-1725	Valenzschwingung	Stark	1697
COOH	2500-3300	Valenzschwingung	Stark	2837
C-O	1210-1320	Valenzschwingung	Stark	1267
Amid				
N-H	3300-3500	Valenzschwingung	Schwach	3300
Aromat				
C=C	1400-1600	Valenzschwingung	Mittel	1542
C=C Doppelbindungen delokalisiert in Aroma System	1650-2000	Valenzschwingung	Schwach	2000
Schwefel				
S-CH ₃	650-700	Valenzschwingung	Schwach	657

3.2.4 Charakterisierung mit dem Massenspektrometer

Durch massenspektrometrische Analysen bei positiver und negativer Ionisation, darunter auch gezielte Fragmentierung durch MS/MS, war es möglich die Struktur des Dipeptides aufzuklären.

Die positive Fragmentierung des OPA-derivatisierten Dipeptides aus der Fraktion, die durch präparativer HPLC gewonnen wurde, wurde mit dem MS gemessen. Danach wurde eine MS/MS Fragmentierung bei den 453 m/z $[M+H]^+$ Massenpeak durchgeführt. Die charakteristischen Fragmente sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17 : Fragmentierung des Dipeptid nach OPA-Derivatisierung bei MS/MS-Analyse (positive Ionisation)

Fragment Nr	m/z	Relativ Intensität [%]
1	453	0,4
2	262	100

Eine MS-Analyse bei positiver Ionisation wurde auch mit dem Dipeptid ohne OPA-Derivatisierung durchgeführt. Das Spektrum der MS/MS-Fragmentierung des Massenpeaks 265 m/z $[M+H]^+$ ist in Anhang 7.30 zu sehen und die charakteristischen Fragmente sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tabelle 18 : Fragmentierung des Dipeptides ohne OPA-Derivatisation bei der MS/MS-Analyse

Fragment Nr	m/z	Relative Intensität [%]
1	265	9
2	264	4
3	144	26
4	130	6
5	122	100
6	119	43
7	84	23
8	39	17

Außerdem wurde noch eine MS/MS-Fragmentierung des Fragmentes 144 m/z von dieser Probe durchgeführt. Das Spektrum befindet sich im Anhang 7.31 und die entstandenen Teilfragmente sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19 : Charakteristische Fragmente der MS/MS Analyse vom Fragment 144 m/ z

Fragment Nr	m/z	Relative Intensität [%]
1	144	100
2	113	40
3	84	40
4	67	60
5	55	14
6	39	100

Es wurde auch eine MS-Analyse des Dipeptides ohne Derivatisierung bei negativer Ionisation durchgeführt. Das Spektrum von der MS/MS-Fragmentierung vom Fragment 263 m/z $[M-H]^-$ befindet sich im Anhang 7.32 und die charakteristischen Fragmente sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Resultate

Tabelle 20 : Fragmentierung des Dipeptides ohne Derivatisierung mit OPA-Reagenz

Fragment Nr	m/z	Relative Intensität [%]
1	263	< 3
2	171	11
3	128	31
4	100	3
5	96	6
6	84	14
7	74	19
8	58	6
9	47	100
10	42	33

3.2.5 Charakterisierung durch das NMR

Verschiedene Analysen wurden mittels NMR durchgeführt. Es wurden ^1H - ^{13}C -HH-COSY-HMQC Messungen durchgeführt. Die Zuordnung der Signale ist in Tabelle 21 aufgelistet (s. Anhang 7.33-7.36).

Tabelle 21 : NMR-Signale von γ -Glutamyl-desoxo-methiin

Kohlenstoffatom Nr.	^1H [ppm]	^{13}C [ppm]
1	-	176,1
2	4,34; dd; 1; $J = 4,58$; 7,79 Hz	54,1
3	2,94; dd; 1; $J = 4,58$; 13,74 Hz 2,75; dd; 1; $J = 7,79$, 13,51 Hz	36,4
4	2,06; s; 3	14,6
5	-	176,4
6	5,69; dd; 1; $J = 4,81$; 10,63 Hz	61,1
7	2,65; m; 1 2,33; m; 1	31,2
8	2,29; m; 1 2,17; m; 1	32,7
9	-	175,4
10	7,68; s; 1	114,7
11	-	124,6
12	7,52; d; 1; $J = 8,24$ Hz	120,0
13	6,87; dd; 1; $J = 7,33$; 8,24 Hz	120,4
14	6,94; dd; 1; $J = 7,33$; 8,47 Hz	121,5
15	7,59; d; 1; $J = 8,47$ Hz	119,9
16	-	130,8
17	-	109,6
18	-	49,4
19, 20, 21	1,22; s; 9	30,2

4 Diskussion

4.1 Auswirkungen von Lagerungsbedingungen auf den Gehalt der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide in *Allium cepa*

4.1.1 Methode

Die Untersuchung der intakten Zellen in den lyophilisierten Proben ergab eine Zellzahl von $880 \pm 398 \text{ mg}^{-1}$. Unter dem Mikroskop waren nur wenige intakte Zellen (Grösse von $35 \text{ }\mu\text{m}$) (s. Abbildung 10 rechtes Bild) zu sehen. Es waren fast ausschließlich Zellfragmente (Größe von $2\text{-}16 \text{ }\mu\text{m}$) (s. Abbildung 10 Links) zu beobachten. Es lässt sich gut erkennen, dass diese Partikel keine vollständigen Zellen sind. Die Partikel weichen vom Aussehen und von der Größe einer Zelle ab. Aufgrund dieser Beobachtung wurde davon ausgegangen, dass eine Extraktion in klassischen Sinne nicht nötig sei, da die Aminosäuren und Cysteinsulfoxide bereits frei vorliegen müssten.

Da die Löslichkeit der Aminosäuren in Wasser besser als in organischen Lösungsmitteln ist, wurde als erstes ein Auszug der Zwiebelproben mit Wasser vorgenommen. Es resultierte ein Extrakt, bei dem das Isoalliin unter der Detektionsgrenze ($6 \cdot 10^{-6} \text{ } \%$) oder, in seltenen Fällen, unterhalb der Bestimmungsgrenze ($2 \cdot 10^{-5} \text{ } \%$) lag. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde versucht, die Zwiebelproben mit Methanol zu extrahieren. Durch die Änderung des Lösungsmittels konnte Isoalliin detektiert und quantifiziert werden. Mit Methiin war dieses Problem kaum zu beobachten. Der Massenanteil im wässrigen Auszug betrug im Mittelwert $0,05 \text{ } \%$ und im methanolischen Auszug $0,11 \text{ } \%$. Dieser Unterschied resultiert aus der Alliinase-Aktivität. Die Alliinase benötigt zur enzymatischen Spaltung der Cysteinsulfoxide Wasser. In reinem Methanol besitzt sie hingegen keine Aktivität. Es kann daher gefolgert werden, dass die Alliinase trotz Lyophilisation zumindest noch eine gewisse Aktivität besitzt. Die Alliinase ist sehr stabil und es zeigte sich, dass sie nicht durch die Gefriertrocknung als solche deaktiviert wird, sondern durch zelluläre Prozesse, die während des langsamen Einfrierens und Auftauens auftreten [25]. Der Prozess zur Lyophilisierung der Zwiebelproben ist nicht bekannt, wodurch keine

genaue Aussage über die Aktivität der Alliinase zu treffen ist. Der Unterschied zwischen den beiden Extraktionsmethoden ist mit Isoalliin besser als mit Methiin zu beobachten, da Isoalliin durch die Alliinase wesentlich schneller hydrolisiert wird. Somit ergibt sich ein Verlust der Hälfte des Massenanteils für Methiin, während Isoalliin annähernd quantitativ abgebaut wurde.

Um sicher zu gehen, dass mit dem methanolischen Auszug die Aminosäuren und Cysteinsulfoxide quantitativ extrahiert wurden, wurde eine bereits validierte Extraktion durchgeführt. Das HPLC-Chromatogramm, das aus diesem Extrakt resultierte, ergab eine schlechte Auflösung und ein stärkeres Hintergrundrauschen als Chromatogramm von dem methanolischen Auszug. Durch die Extraktion wurden sämtliche Inhaltsstoffe (Proteine, Zucker und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe) von *Allium cepa* gewonnen. Während der Chromatographie eluierten diese Inhaltsstoffe auch von der Säule. Auch wenn diese Inhaltsstoffe nicht durch die Detektion, erfasst werden, so stören sie jedoch die Elution der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide. Der Faktor für jede Aminosäure und jedes Cysteinsulfoxid ermöglicht die Umrechnung vom methanolischen Auszug gegenüber der Extraktion.

Es ergab sich ein Faktor von 0,60 für Isoallin. Das bedeutet, dass mit dem methanolischen Auszug fast doppelt so viel Isoalliin extrahiert wurde. Da Isoalliin einen wichtigen Marker für die Zwiebelqualität darstellt, wurde vor allem aus diesem Grund der methanolische Auszug als Extraktionsmethode verwendet.

Eine Erklärung für die größere Menge an Isoalliin im methanolischen Auszug bietet die Thermolabilität vom Isoalliin [35]. Bei der Extraktion wurden die Proben erhitzt. Auch wenn es nur ca. 65°C waren, so könnte sich daraus schon ein Effekt ergeben haben. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Alliinase nicht vollständig inaktiviert wurde. Bei der Zugabe von Wasser könnte sie das Isoalliin umsetzen.

Bei der Probe E10 ergab sich für jede Aminosäure und jedes Cysteinsulfoxid ein geringerer Massenanteil als bei allen anderen Proben dieser Reihe. Möglicherweise gab es ein Problem mit der Probenvorbereitung. Um zu sehen, ob diese Probe als Ausreißer zu werten ist, wurde der Test auf Ausreißer von David Hartley und Pearson angewandt. Beim Testen aller Aminosäuren und Cysteinsulfoxide ergab sich, dass es sich bei dieser Probe um keinen Ausreißer handelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von α beträgt 5 %. Die bestimmten Mengen liegen unterhalb der Mengen der anderen Proben aus dieser Reihe, da bei dieser lyophilisierten Probe das Pulver agglomeriert vorlag. Dadurch konnten sich während des methanolischen Auszuges die Inhaltsstoffe nicht gut lösen. Die Löslichkeit war dennoch hoch genug um diese Werte in die Auswertung mit einzubeziehen.

Bei den Analysen mittels HPLC und HPLC-MS zeigte sich bei Phenylalanin und Leucin ein Inversion der Elutionsreihenfolge. Beide Aminosäuren eluieren von einer Umkehrphase-Säule zeitlich nahe beieinander. Bei der HPLC-MS wurde ein anderes Fließmittel verwendet (Ammoniumacetatpuffer anstatt Phosphatpuffer). Zudem war der Fließmittelgradient anders. Möglicherweise bedingen diese beiden Faktoren die Inversion der Elutionsreihenfolge beider Aminosäuren.

4.1.2 Lagerungsergebnisse

Wegen ihrer wichtigen Rolle als Aroma-Precursor für den Geschmack und den Geruch von Zwiebeln, sind die ersten Inhaltsstoffe, die man betrachten sollte, die Cysteinsulfoxide. In den vorliegenden Zwiebelproben wurden erwartungsgemäß Isoalliin und Methiin gefunden. Das Vorkommen dieser beiden Cysteinsulfoxide wird bereits in der Literatur beschrieben [12]. In der Literatur wird erwähnt, dass zusätzlich zu Isoalliin und Methiin ebenso Propiin in der Küchenzwiebel enthalten ist. Propiin konnte jedoch in den vorliegenden Proben nicht gefunden werden [12]. Der Massenanteil von Isoalliin war vor der Lagerung höher (0,48%) als der von Methiin (0,13%). Die Werte aus der Literatur lauten für Isoalliin 1,56 mg/g im Frischgewicht [12]. Der Wert von dieser Arbeit wurde für die lyophilisierte Pflanzen berechnet, dafür musste der Wert wieder berechnet

werden, dafür wurde angenommen, dass die Zwiebeln 65 % Wasser enthalten [1]. Der Wert für Isoalliin beträgt errechnet 1,70 mg/g im Frischgewicht. Das bedeutet, dass die methanolische Auszug hat die ganze Menge in Isoalliin extrahiert.

Die t-Tests für Isoalliin und Methiin ergaben, dass sich die drei Reihen nicht signifikant unterscheiden, obwohl die Graphik (s. Abbildung 16) den Anschein vermittelt, der Massenanteil von Methiin nähme während der Lagerung ab. Dieses war unter beiden Lagerungsbedingungen bei gleichem Massenanteil zu beobachten. Bezüglich Isoalliin ist in Abbildung 17 zu sehen, dass die Konzentration allgemein während der Lagerung zunimmt. Mit Ethylen jedoch nicht so stark, wie das bei der Lagerung mit Sauerstoff der Fall ist. Der t-Test zeigt jedoch keine Signifikanz hinsichtlich der zwei verschiedenen Lagerungsmethoden mit Luft und Ethylen, was den Massenanteil der Cysteinsulfoxide betrifft.

Für die Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Histidin, Serin, Threonin, Glycin, Tryptophan, Asparagin, Glutamin, Arginin und Tyrosin/Alanin gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Reihen. Valin, Isoleucin, Phenylalanin, Leucin und γ -Glutamyl-Isoalliin waren die einzigen Inhaltsstoffe, bei denen sich ein signifikanter Unterschied ergab. Aber diese Differenz war nicht zwischen jeder der drei Reihen zu sehen, sondern sie war jedes Mal nur zwischen KOI und KOII zu beobachten. Das heißt, dass während der Lagerung mit Luft der prozentuale Massenanteil dieser Aminosäuren signifikant abnimmt. Bei Ethylen ist dann kein Unterschied zu Kontrolle KOI zu erkennen; folglich wäre die Lagerung mit dieser Technik für den Gehalt dieser Inhaltsstoffe besser.

Eine wichtige Sache, die man zur Kenntnis nehmen sollte ist, dass nur bei fünf der untersuchten 18 Aminosäuren und Cysteinsulfoxide ein signifikanter Effekt zu bemerken ist. Das würde heißen, dass es für die 13 anderen Aminosäuren und Cysteinsulfoxide keinen Unterschied im prozentualen Massenanteil während der Lagerung gibt. Dieses Ergebnis überrascht. Für die Aminosäuren ist kein

Vergleich mit der Literatur möglich, weil diese Fragestellung zuvor noch nicht untersucht wurde. Lediglich für die Cysteinsulfoxide wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Uddin et al. zeigte, dass die Gesamtmenge an Cysteinsulfoxiden bei der Lagerung in einer regulären Atmosphäre (21% O₂, 0,1% CO₂) innerhalb von neun Wochen signifikant um 12,3% steigt [12]. Dem selben Ergebnis, bezüglich der Lagerung unter regulärer Atmosphäre, kam ebenso Kospell et al. [12].

Nun kommt die Frage auf, warum die Arbeit zeigt, dass es keinen Effekt gibt bzw. dieser nicht sonderlich groß ist. Die nicht vorhandene Signifikanz resultiert aus der großen Standardabweichung der unterschiedlichen Reihen. Diese Unstimmigkeit hat ihren Ursprung nicht in der HPLC-Messung, denn die Reproduzierbarkeit von den drei HPLC-Analysen ist sehr hoch (getestet von Kusterer [38]). Als zweites muss man den Unterschied der acht Zwiebelproben für jede Reihe betrachten. Die Verschiedenheit der einzelnen Zwiebeln, und damit die unterschiedliche Zusammensetzung ihrer Aminosäuren, zeigt, wie wichtig es ist, verschiedene Zwiebeln als Testobjekt zu nehmen. Um einen lagerungsabhängigen Effekt zu sehen, benötigt man mindestens zehn Zwiebeln. Bei 20-25 Zwiebeln ist die Genauigkeit größer [39]. Uns lagen ursprünglich zehn Proben vor, von denen leider nur acht verwendet werden konnten, da für die Versuchsreihe der Lagerung unter Ethylen nur acht Proben vorlagen.

Der signifikante Effekt des Abnehmens von γ -Glutamyl-Isoalliin wurde erwartet. Dieses Dipeptid wird durch die γ -Glutamyl-Transpeptidase hydrolysiert. Durch diese Reaktion wird Isoalliin und Glutamat freigesetzt. Daher sollte der prozentuale Massenteil von Isoalliin proportional mit dem Abnehmen von γ -Glutamyl-Isoalliin steigen [1, 25, 40]. In den vorliegenden Resultaten war nur ein geringer Effekt zu beobachten. Tatsächlich war die Zunahme von Isoalliin nicht signifikant, obwohl eine geringe Tendenz auf der Darstellung zu sehen war. Die Zunahme von Isoalliin war bei der Lagerung unter Ethylen nicht so groß wie die unter Luft. Neben Isoalliin nahm auch der Gehalt an Glutamat zu.

Die aus den Untersuchungen resultierenden Ergebnisse zeigen, dass es nicht möglich ist, einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Lagerungen festzustellen. Für die Lagerung mit Ethylen gibt es dennoch eine sichtbare Tendenz (Valin, Isoleucin, Phenylalanin, Leucin und γ -Glutamyl-Isoalliin haben eine signifikante Tendenz, Arginin, Asparagin und Isoalliin eine leichte Tendenz hin zur Lagerung in Ethylen), dass diese Lagerungsmethode den geringeren Verlust an verschiedene Inhaltsstoffe ermöglicht.

Um einen größeren Effekt der Lagerungsbedingungen zu sehen, sollte der Zwiebellagerungsversuch über einen längeren Zeitraum laufen. Möglicherweise würde man dann öfter einen signifikanten Effekt zwischen den Reihen erhalten.

Es wäre auch interessant gewesen, parallel zur Bestimmung der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide, den absoluten Gehalt an Brenztraubensäure zu ermitteln, um darüber die Alliinase-Aktivität zu bestimmen. Diese könnte zudem noch über eine Ammoniakelektrode erfasst werden. Diese beiden Analysen könnten ebenfalls eine Aussage über die Zwiebel Qualität geben.

4.2 Strukturaufklärung des Dipeptides aus *A. rubellum*

Die Struktur des Dipeptides wurde mittels UV, FT-IR, MS, MS/MS und NMR aufgeklärt. Es ergab sich das Molekül 2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfanyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure (γ -Glutamyl-desoxo-methiin). Alle erzielten Resultate werden im Folgenden diskutiert. Die Strukturaufklärung erfolgt aus dem entsprechenden OPA-Derivat, da das Dipeptid nur nach Derivatisierung von den anderen Inhaltsstoffen getrennt werden konnte.

4.2.1 FT-IR und UV-Spektrum

Aus den verschiedenen Information von der FT-IR und UV-Spektrum lässt sich schlussfolgern, dass das unbekannte Molekül ein Dipeptid sein muss. Die maximalen Absorptionen vom UV-Spektrum sind bei 254 für einen Aromat und bei 335 nm spezifisch für das Isoindol. Es ergab sich die charakteristische IR-Absorption einer Säure und eines Amids. Interessant ist auch, dass auf dem FT-IR-Spektrum erkennen kann, dass dieses Molekül ein Schwefel-Atom besitzt.

4.2.2 MS-Messungen

Mit den verschiedenen MS-Analysen war es möglich die Struktur von γ -Glutamyl-desoxo-methiin zu beweisen. Die MS-Analyse der durch präparative HPLC gewonnenen Fraktion ergab sich bei der Injektion bei positiver Ionisation ein Massenpeak von 453 m/z $[M+H]^+$. Die Fragmentierung dieses Peaks per MS/MS ergab einen Fragment, dass eine Masse von 262 m/z $[M+H]^+$ hatte. Dabei handelt es sich um die Fragmentierung zwischen dem Dipeptid und OPA-Rest. Das Masse zu Ladungsverhältnis von 262 m/z $[M+H]^+$ entspricht der Masse des Dipeptides nach dem Verlust des OPA-Rest (s. Abbildung 22).

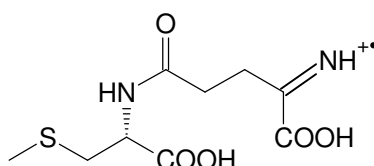


Abbildung 22 : Fragment der Dipeptid nach die MS/MS Fragmentierung vom Massenpeak

453 m/z $[M+H]^+$

Das erste charakteristische Signal bei der positiven Fragmentierung des Dipeptides ohne OPA-Derivatisierung (s. Abbildung 23 und 24) ist der Massenpeak 265 m/z $[M+H]^+$. Die Masse von γ -Glutamyl-desoxo-methiin beträgt demnach 264 g/mol. Aus der Spaltung der Säureamid-Gruppe ergeben sich zwei charakteristische Fragmente von 130 und 122 m/z. Bei dem Fragment von 122 m/z wird zusätzlich die Methyl-Gruppe vom Schwefel-Atom abgespalten. Das Fragment 119 m/z resultiert aus der Spaltung neben dem Stickstoff des Säureamides (s. Abbildung 24). Das letzte Fragment von 144 m/z wird nach Abspaltung von CO_2 , Dimethylsulfid und Desaminierung gebildet (s. Abbildung 24).

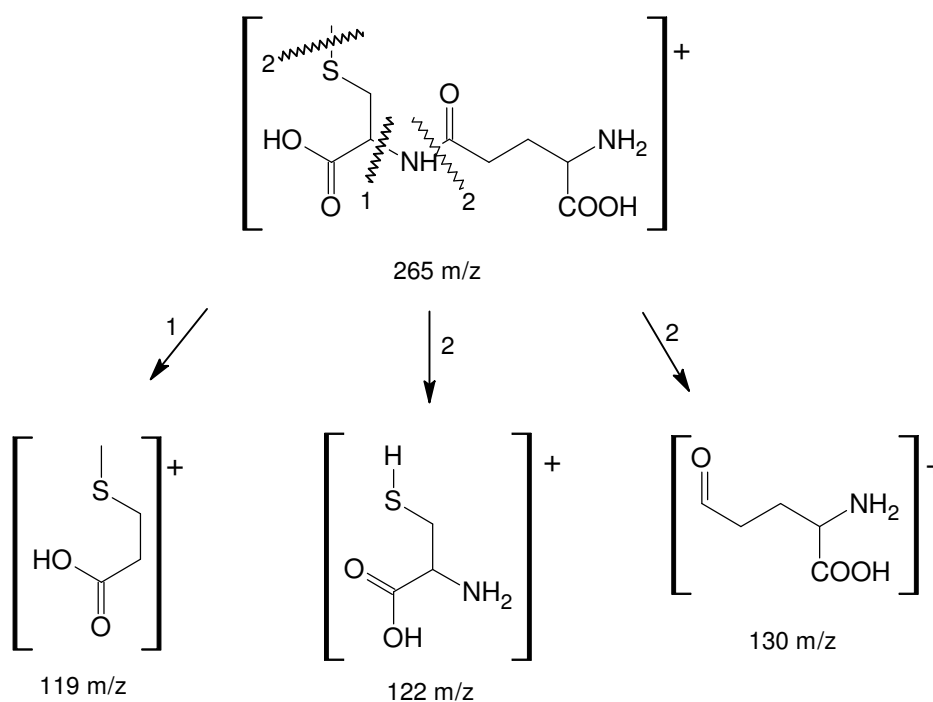


Abbildung 23 : Fragmentierungs-Schema von γ -Glutamyl-desoxo-methiin ohne OPA-Derivatisierung bei positiver Ionisation

Das Fragment von 113 m/z, welches aus der MS/MS Fragmentierung des Fragmentes 144 m/z entsteht, konnte nicht genau geklärt werden. Dabei handelt es sich vermutlich um ein instabiles Fragment, das nur über einen kurzen Zeitraum besteht. Das Fragment von 84 m/z entsteht aus der Fragmentierung neben dem Stickstoff (s. Abbildung 24). Dieses Fragment bildet dann ein Fragment 67 m/z nach der α -Spaltung neben dem Heteroatom. Von diesem

Fragment wird CH_2 abgespalten und ein Fragment von 55 m/z gebildet. Das letzte zu beobachtende Fragment von 39 m/z entsteht aus dem Verlust des Sauerstoffs (s. Abbildung 24).

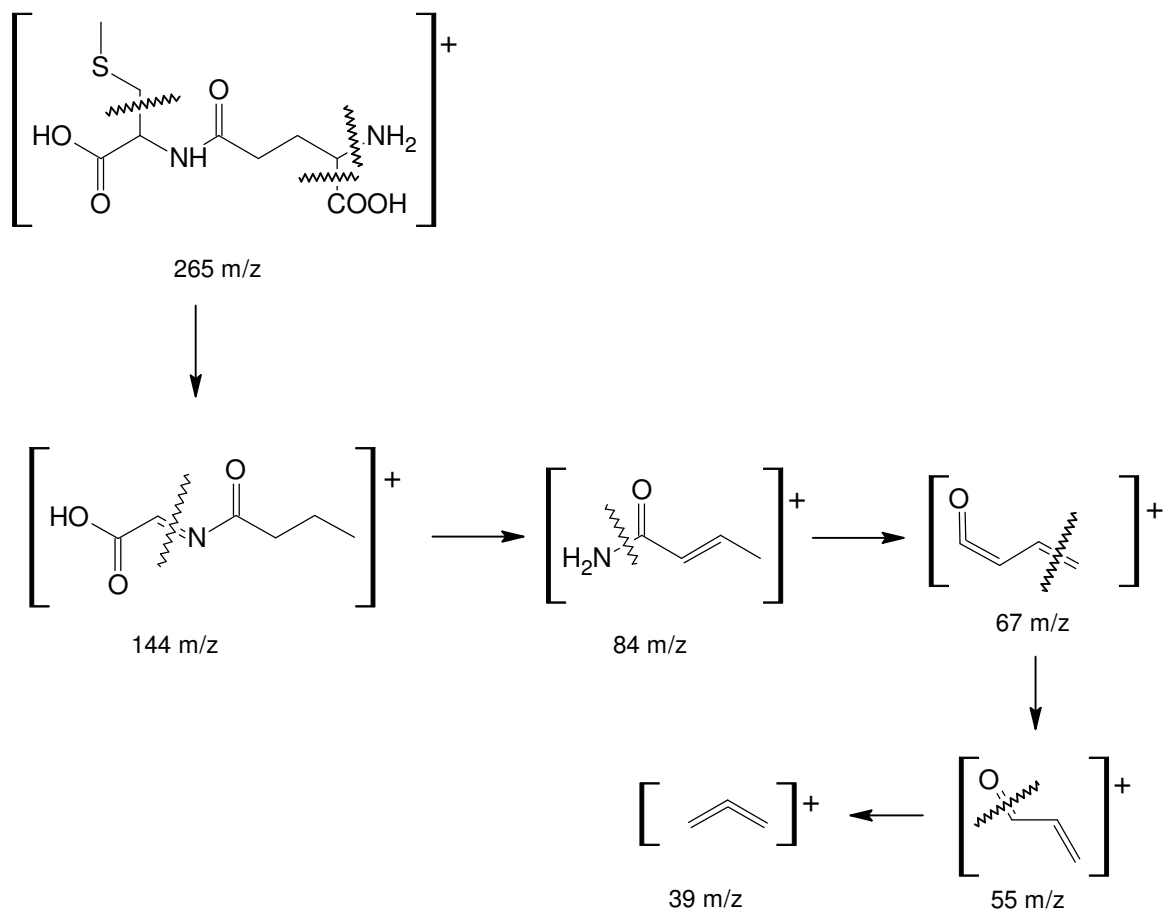


Abbildung 24 : Fragmentierungs-Schema der MS/MS-Fragmentierung vom Fragment 144 m/z

Die Fragmentierung des γ -Glutamyl-desoxo-methiin ohne OPA-Derivatisierung bei negativer Ionisation (s. Abbildung 25 und 26) ergibt einen Massenpeak von 263 m/z $[M-H]^-$. Aus diesem Massenpeak wird eine CO_2 -Gruppe und die SCH_3 -Gruppe abgespalten, wodurch Fragment von 171 m/z und 47 m/z entstehen. Bei dem 171 m/z-Fragment wird die Säueramidegruppe gespalten und bildet ein Fragment von 128 m/z (s. Abbildung 25) und 100 m/z (s. Abbildung 26). Das Fragment 96 m/z entsteht aus dem Verlust des Sauerstoffes vom 128 m/z-Fragment.

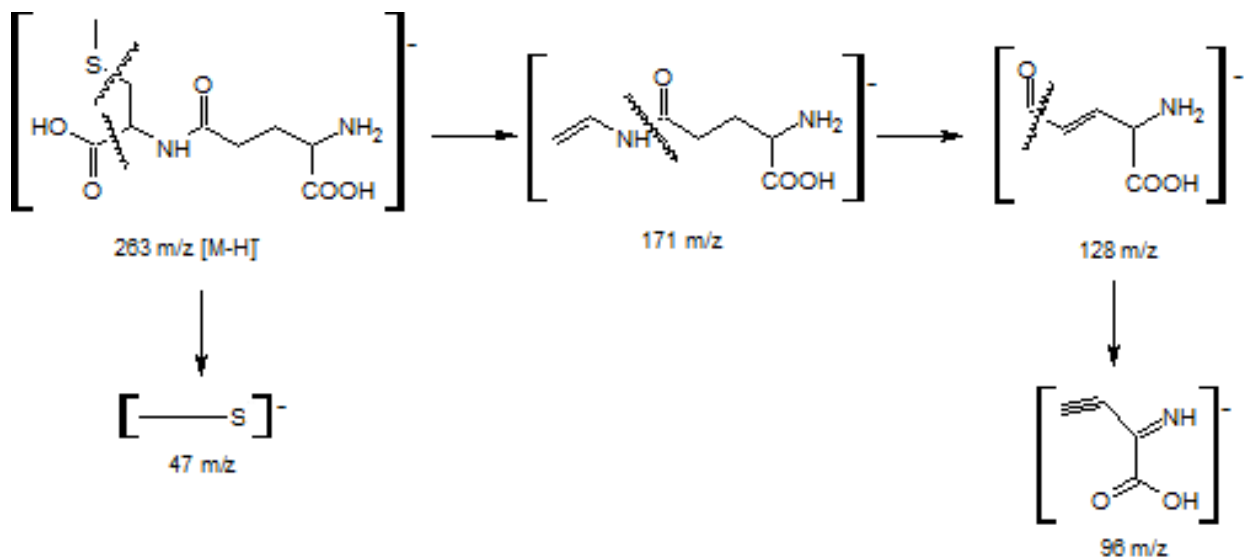


Abbildung 25 : MS/MS-Fragmentierungs-Schema von γ -Glutamyl-desoxo-methiin ohne OPA-Derivatisation im negativen Modus I

Bei dem Fragment von 100 m/z bricht entweder die C-C Doppelbindung und bildet 84 m/z oder die Ethylen-Gruppe wird abgespalten und bildet 74 m/z. Der hintereinander eintretende Verlust von Sauerstoff und Stickstoff resultiert in zwei Fragmenten: 58 m/z und 42 m/z (s. Abbildung 26).

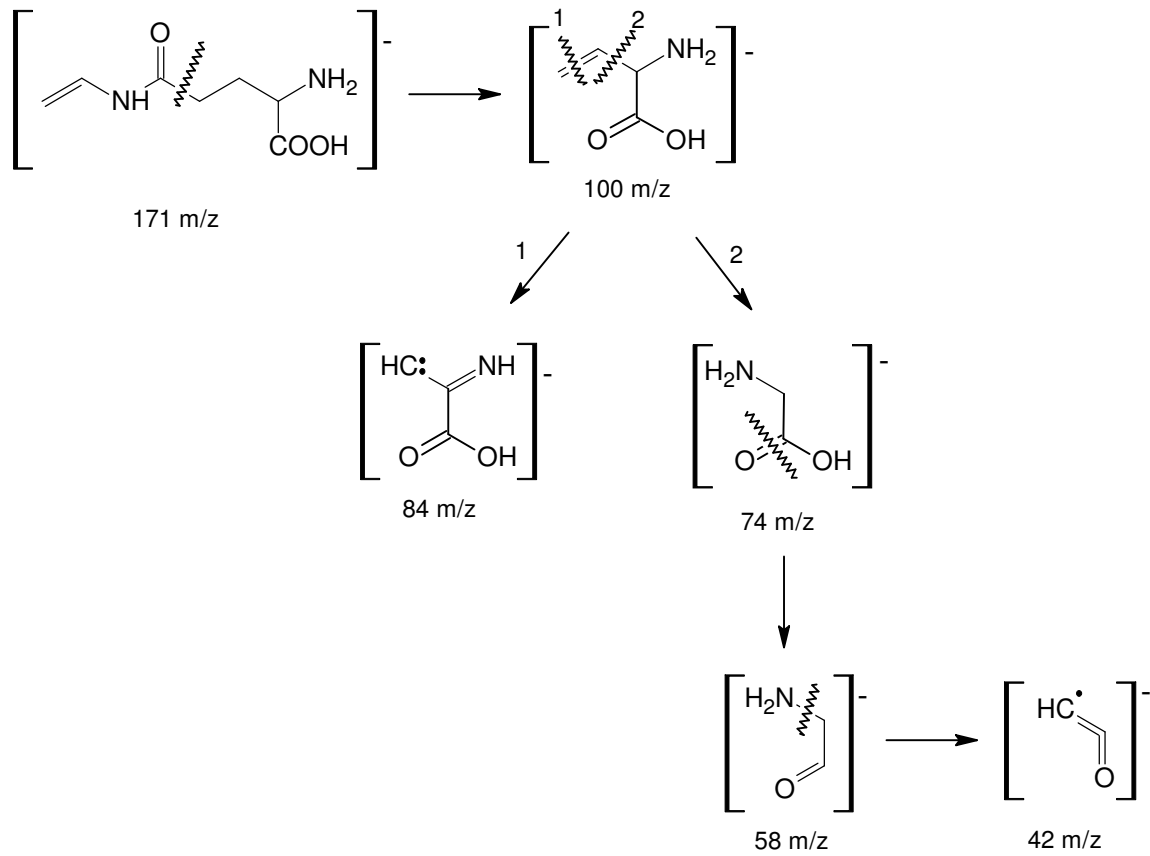


Abbildung 26 : Fragmentierungs-Schema von Glutaryl-desoxo-methiin ohne OPA-Derivatisierung im negativen Modus II

4.2.3 NMR-Messungen

Die Konzentration des Extraktes aus *A. rubellum* war für einige 2D-NMR-Experimente zu niedrig. Einige Signale waren sehr schwach und die Korrelationen nur undeutlich zu erkennen. Diese Signale wurden dann durch einen Vergleich mit anderen Spektren aus Kusterer [38] zugeordnet.

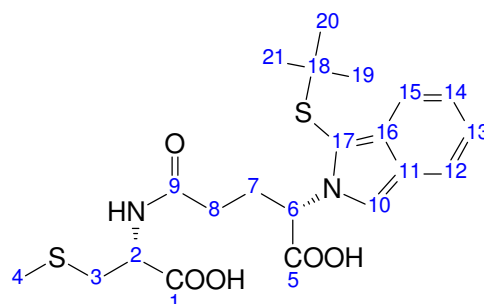


Abbildung 27 : Struktur der Dipeptid nach die OPA-Derivatisierung mit nummerierten Kohlenstoffatomen

Die typischen Signale des Isoindol-Ringsystemes und t-Butyl-Restes sind erkennbar. Die Verschiebungen der aromatischen Wasserstoffe vom Isoindolring sind liegen zwischen 6,87 und 7,52 ppm. Sie stehen im Einklang mit Ergebnissen von OPA-derivatisierten L-(+)-Alliin [38]. Es war möglich die verschiedenen Signale zuzuordnen (s. Abbildung 27). Der Wasserstoff an C10 (7,68 ppm) ist zu erkennen, weil sein Signal ein Singulett ist und im H-H-COSY nur mit sich selbst koppelt. Die neun Wasserstoffe der Methyl-Gruppen des t-Butyl-Restes (C19-21) ergeben zusammen nur ein Signal (1,22 ppm, Integral von 9). Das Signal des quartären Kohlenstoffes C18 des t-Butyl-Restes lag bei 49,4 ppm im ^{13}C -Spektrum und konnte in Verbindung mit der Literatur erkannt werden [38]. Die anderen quartären Kohlenstoffe wurden auch mittels Vergleich mit der Literatur zugeordnet. Der Literaturwert gibt an wo die Signale zu erwarten sind. Dieser Vergleich war möglich, da die Signale bei jedem mit OPA-derivatisierten primären Amin gleich sind. Es war möglich zu erkennen welche Signale zu C12-15 gehören aber die Signale des ^{13}C und ^1H an den Kohlenstoff-Atomen 15 und 12 bzw. 13 und 14 konnten nicht unterschieden werden. Die

erhaltenen Signale wurden daher durch einen Vergleich mit bereits vorhandenen HMBC-Messungen [38] zugeordnet (s. Tabelle 21).

Das γ -Glutamyl ist charakterisiert durch eine Ethylen-Gruppe (C7 und C8 bzw. die Wasserstoff-Atome an diesen C-Atomen bei 2,65; 2,33 und 2,17; 2,29 ppm). Im HH-COSY war es möglich zu sehen, dass der Wasserstoff am chiralen C-Atom in Position 6 eine Verschiebung von 5,69 ppm aufweist und mit den zwei Wasserstoffen bei 2,65 und 2,33 ppm koppelt. Weitere Kopplungen des γ -Glutamyls waren nicht deutlich erkennbar. Durch den Vergleich des Spektrums mit der Literatur, wurde es möglich die Wasserstoffe an C8 einzuordnen (s. Tabelle 21) [22]. Die anderen Signale, die von der Zuordnung problematisch waren, waren die quartären Kohlenstoffe der Carboxylgruppen, weil sie im ^{13}C -Spektrum kaum zu sehen waren. Um das zu schaffen wurde des ^{13}C -Spektrum mit dem Literaturwert abgeglichen [38]. Nur damit war es möglich die Signale richtig einzuordnen.

Der Wasserstoff an C2 hatte eine chemische Verschiebung von 4,34 ppm. Es koppelte mit den Wasserstoffen an C3 ($J=4,58$; 7,79 Hz) bei 2,94 und 2,75 ppm. Die Verschiebungen von diesen beiden liegen höher als die Verschiebung der Wasserstoffe der Ethylen-Gruppe im γ -Glutamyl-Rest, da der Schwefel benachbart ist. Die drei Wasserstoffe an C4 sind als Singulett bei 2,06 ppm vorhanden.

Die L-Stereochemie des γ -Glutamyl-desoxo-methiin wurde vorausgesetzt, da dieses Dipeptid in Zwiebeln von *A. rubellum* vorkommt und alle bisher natürlich gefundene Cysteine L-konfiguriert sind [1]. Außerdem waren die Verschiebungen der gefundenen Signale im Einklang mit denen aus vorhergehenden Arbeiten im Arbeitskreis.

5 Zusammenfassung

In den Zwiebelproben von *Allium cepa* „Copra“, die aus dem Lagerungsversuch der Universität Hohenheim (Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie) stammen, sollte der Einfluss von verschiedenen Lagerungsbedingungen (Lagerung mit Luft, bzw. Ethylen) auf die Menge an Inhaltsstoffen untersucht werden.

Für die lyophilisierten Proben, in denen die Zellen größtenteils aufgeschlossen waren, ergab sich ein Auszug mit Methanol als optimale Probenvorbereitung für eine HPLC-Messung. Die HPLC-Messungen erfolgten nach Derivatisierung der Aminosäuren und Cysteinsulfoxide durch *ortho*-Phthaldialdehyd. Nach Kalibration der Säule mit synthetischen L-(+)-Alliin, konnten die Cysteinsulfoxide und Aminosäuren quantifiziert werden.

Die Ergebnisse ergaben für die Cysteinsulfoxide keinen signifikanten Effekt in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. Da γ -Glutamyl-Isoalliin durch die Transpeptidase gespalten wird, kam es während der Lagerung zu einer Zunahme an Isoalliin. Diese war auf der Darstellung sichtbar, auch wenn sie nicht signifikant war, und lag bei Ethylen als Lagermedium nicht so hoch wie unter Luftlagerung. Für die Aminosäuren war ein Effekt nur bei fünf von ihnen (γ -Glutamyl-Isoalliin, Valin, Isoleucin, Phenylalanin und Leucin) zu beobachten. Dieser Effekt resultierte immer zwischen den Kontrollproben (vor der Lagerung) und den Proben nach achtwöchiger Lagerung unter Luft. Für Asparagin und Arginin gab es die Tendenz, dass mit Ethylen der Gehalt dieser beiden Aminosäure weniger abnahm.

Weiterhin konnte in der Arbeit erstmals ein Dipeptid in seiner Struktur aufgeklärt werden, dass in *Allium rubellum* vorkommt. Die Strukturaufklärung wurde mit FT-IR-MS-MS/MS- und NMR-Analysen durchgeführt. Eine HR-ESI-Messung wurde hingegen nicht vorgenommen. Es ergab sich die Struktur von 2-Amino-5-[[1-carboxy-2-(methylsulfanyl)ethyl]amino]-5-oxopentansäure (γ -Glutamyl-desoxomethiin). Es handelt sich vermutlich um eine Vorstufe in der Biosynthese des Methiins.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Koch H. P., Lawson L. D., Garlic, The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. And Related Species, Second Edition, Baltimore, Philadelphia, London, Paris, 1996.
- [2] Fritsch R. M., Keusgen M., Occurrence and Taxonomic significance of Cysteine Sulfoxides in the Genus *Allium* L. (Alliaceae), *Phytochemistry* 67, 1127-1135, 2006.
- [3] Keusgen M., Health and Alliums, In *Allium Crop Science: recent advances*, CABI, Rabinowitsch H. D., Currah L., 357-378, 2002.
- [4] Dorsch W., *Allium cepa* L. (Onion, Part 2): Chemistry and Analysis and Pharmacology, *Phytomedicine* 3, 391-397, 1996.
- [5] Kumari K., Augusti K., Antidiabetic Effects of S-methylcysteine Sulfoxide on alloxan diabetes, *Planta Med.* 61, 72-74, 1995.
- [6] Mütsch-Eckner M., Meier B., Wright A. D., Reversed-phase high-performance liquid chromatography of S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in *Allium sativum* including the determination of (+)-S-allyl-L-cystein Sulfoxide, γ -glutamyl-S-L-cystein and γ -L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine, *Journal of Chromatography A* 625, 183-190, 1992.
- [7] Block E., Die Organoschwefelchemie der Gattung *Allium* und ihre Bedeutung für die organische Chemie des Schwefels, *Angew. Chem.* 104, 1158-1203, 1992.
- [8] Rose P., Whiteman M., S-alk(en)yl cystein Sulfoxide Metabolites in the Genus *Allium*: the Chemistry of Potential Therapeutic Agents, *Nat. Prod. Rep.* 22, 351-368, 2005.
- [9] Fritsch R. M., Friesen N., Evolution, Domestication and Taxonomy, In *Allium Crop Science: recent advances*, CABI, Rabinowitsch H. D., Currah L., 5-30, 2002.
- [10] Friesen N., Fritsch R. M., Blattner F. R., Phylogeny and new Intrageneric Classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA its Sequences, *Aliso.* 22, 372-395, 2006.
- [11] Griffiths G., Trueman L., Crowther T., Thomas B., Smith B., Onions—A Global Benefit to Health, *Phytother. Res.* 16, 603–615, 2002.

- [12] Uddin M., MacTavish H. S., Controlled Atmosphere and regular Storage-induced changes in S-alk(en)-yl-L-cystein Sulfoxides and Alliinase activity in Onion Bulbs (*Allium cepa* L. cv Hysam), Postharvest Biology and Technology 28, 239-245, 2003.
- [13] Khoshoo T. N., Sharma V. B., Cytology of the autotriploid *Allium rubellum*, Chromosoma 10, 136-143, 1959.
- [14] Kusterer J., Vogt A., Keusgen M., Isolation and Identification of a new Cysteine Sulfoxide and Volatile Sulfur Compounds from *Allium* Subgenus *Melanocrommyum*, J. Agric. Food Chem. 58, 520-526, 2010.
- [15] Keusgen M., Biosensorische Methoden zur quantitative Bestimmung von Cysreinsulfoxiden, Shaker Verlag, Aachen, Deutschland, 1999.
- [16] Breu W., *Allium cepa* L. (Onion, Part 1): Chemistry and Analysis, Phtomedicine 3, 293-306, 1996.
- [17] Kubec R., Kim S., McKeon M. D., Isolation of S-n-Butylcysteine Sulfoxide and Six n-Butyl-Containing Thiosulfinates from *Allium siculum*, J. Nat. Prod. 65, 960-964, 2002.
- [18] Kuebec R., Svobodová M., Distribution of S-Alk(en)ylcysteine Sulfoxides in Some *Allium* Species. Identification of a New Flavor Precursor: S-ethylcysteine Sulfoxide (Ethiin), J. Agric. Food Chem. 48, 428-433, 2000.
- [19] Kuettner E. B., Hilgenfeld R., Weiss M. S., Purification, Characterization, and Crystallization of Alliinase from Garlic, Archives of Biochemistry and Biophysics 402, 192-200, 2002.
- [20] Kubec R., Kim S., Musah R. A., S-Substitued cysteine derivatives and Thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea*- part II, Phytochemistry 60, 21-25, 2002.
- [21] Jedelská J., Vogt A., Reinscheid U. M., Keusgen M., Isolation and Identification of a Red Pigment from *Allium* Subgenus *Melanocrommyum*, J. Agric Food Chem 56, 1465-1470, 2008.
- [22] Kusterer J., Keusgen M., Cysteine Sulfoxides and Volatile Sulfur Compounds from *Allium tripedale*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 1129-1137, 2010.

- [23] Lancaster J. E., Shaw M. L., Metabolism of γ -Glutamyl Peptides during Development, Storage and Sprouting of Onion Bulbs, *Phytochemistry* 30, 2857-2859, 1991.
- [24] Lancaster J. E., Shaw M., Randle M., Differential Hydrolysis of Alk(en)yl Cysteine Sulphoxides by Alliinase in Onion Macerates: Flavour Implications, *J. Sci. Food Agri.* 78, 367-372, 1998.
- [25] Randle W. M., Lancaster J. E., Sulphur Compunds in Alliums in Relation to Flavour Quality, In *Allium Crop Science: recent advances*, CABI, Rabinowitsch H. D. Currah L., 357-378, 2002.
- [26] Kasai T., Larsen P. O., γ -Glutamyl peptid from *Allium sativum* Bulbs, *Porg. Chem. Nat. Prod.* 39, 173-285, 1980.
- [27] Shimon L. J. W., Rabinkov A., Shin I., Two structures of Alliinase from *Allium sativum* L.: Apo form and Ternary Complex with Aminoacrylate Reaction Intermediate Covalently Bound to the PLP Cofactor, *J. Mol. Biol.* 366, 611-625, 2007.
- [28] Lancaster J., Collin H. A., Presence of Alliinase in isolated Vacuoles and of alkyl Cysteine Sulfoxides in the Cytoplasm of Bulbs of Onion Plant, *Sci letters* 22, 169-176, 1981.
- [29] Krest I., Glodek J., Keusgen M., Cysteine Sulfoxide and Alliinase Activity of Some *Allium* Species. *J. Agric. Food Chem* 48, 3753-3760, 2000.
- [30] Luthra P. M., Luthra R., Propanthial S-oxide synthase: Potential target to develop Flavoursome, Nonlachrymatory user-friendly Onions, *Current Science* 83, 12, 2002.
- [31] Lanzotti V., The analysis of Onion and Garlic. *Journal of Chromatography A.* 1112, 3-22, 2006.
- [32] Gubb I.R., MacTavish H.S., Onion Pre-and Postharvest Considerations: In *Allium Crop Science: recent advances*, CABI, Rabinowitsch H. D., Currah L., 233-265, 2002.
- [33] Downes K., Chope G. A., Terry L. A., Postharvest application of Ethylene and 1-methylcyclopropene either before or after Curing Affects Onion (*Allium cepa* L.) Bulb quality during long term cold Storage. *Postharvest Biology and Technology* 55, 36-44, 2010.

- [34] Karagiannis C.S., Pappelis A.J., Ethylene ist a selective ribosomal cistronregulator in *Allium cepa* epidermal cells, Mechanism of Ageing and developpement 72, 199-211, 1993.
- [35] Kubec R., Svobdová M., Velíšek J., Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine Sulfoxides, Journal of Chromatography A 862, 85-94, 1999.
- [36] Schmitt, B.G., Analyse von Cysteinsulfoxiden in *Allium*, Promotionsarbeit, Universität Bonn, 2004.
- [37] Jedelská, J., Pharmaceutical Value of Onion (*Allium L.*) and related species of Central Asia, Promotionsarbeit, Universität Marburg, 2007.
- [38] Kusterer J., Neue Erkenntnisse der Schwefelchemie und chemotaxonomie in Arten des Genus *Allium*, Univesität Marburg, 2010.
- [39] Randle W. M., Lancaster J. E., Sulfur Compounds in *Allium* in Relation to Flavour Quality: In *Allium* Crop Science: recent advances, CABI, Rabinowitsch H. D., Currah L., 329-355, 2002.
- [40] Lancaster J. E., Shaw M. L., Metabolism of γ -glutamyl Peptides during development Storage and Sprouting of Onion Bulbs, Phytochemisrty 30, 2857-2859, 1991.